

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
16. Januar 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/004659 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/07281

(22) Internationales Anmeldedatum:  
2. Juli 2002 (02.07.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 31 786.7 4. Juli 2001 (04.07.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE). INSTITUT F. PFLANZENGENETIK [DE/DE]; u. Kulturpflanzenforschung, Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PUCHTA, Holger [DE/DE]; Über der Eine 16a, 06449 Aschersleben (DE). BIESGEN, Christian [DE/DE]; Reichenstr. 29, 06484 Quedlinburg (DE).

(74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



BEST AVAILABLE COPY

WO 03/004659 A2

(54) Title: RECOMBINATION SYSTEMS AND A METHOD FOR REMOVING NUCLEIC ACID SEQUENCES FROM THE GENOME OF EUKARYOTIC ORGANISMS

(54) Bezeichnung: REKOMBINATIONSSYSTEME UND VERFAHREN ZUM ENTFERNEN VON NUKLEINSÄURESEQUENZEN AUS DEM GENOM EUKARYOTISCHER ORGANISMEN

(57) Abstract: The invention relates to recombination systems and to a method for removing nucleic acid sequences from the chromosomal DNA of eukaryotic organisms. The invention also relates to transgenic organisms (preferably plants), containing said systems or produced by said method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Rekombinationssysteme und Verfahren zum Entfernen von Nukleinsäuresequenzen aus der chromosomalen DNA eukaryotischer Organismen, sowie transgene Organismen - bevorzugt Pflanzen - die diese Systeme enthalten bzw. mit diesen Verfahren hergestellt wurden.

Rekombinationssysteme und Verfahren zum Entfernen von Nukleinsäuresequenzen aus dem Genom eukaryotischer Organismen

## 5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft Rekombinationssysteme und Verfahren zum Entfernen von Nukleinsäuresequenzen aus dem Genom eukaryotischer Organismen, sowie transgene Organismen - bevorzugt Pflanzen -

10 die diese Systeme enthalten.

Ziel der biotechnologischen Arbeiten an Organismen ist unter anderem die Gewinnung von kommerziell verwertbaren Informationen über die Funktion bestimmter Gene und Genprodukte sowie die Auf-  
15 klärung von Biosynthesewegen oder Krankheitsmechanismen. Die so gewonnenen Informationen können vielfältig eingesetzt werden. Sie dienen beispielsweise der Erzeugung neuer Medikamente, der Entwicklung von alternativen, biotechnologischen Produktionsverfahren oder der Erzeugung modifizierten Pflanzen. Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von  
20 Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika (Dunwell JM, J Exp Bot. 2000;51  
25 Spec No:487-96).

Bei der Herstellung transgener Organismen ist aufgrund der geringen Effizienz der verwendeten Methoden (wie beispielsweise der stabilen Transformation oder insbesondere der homologen  
30 Rekombination) eine Selektion der in der gewünschten Weise modifizierten Organismen erforderlich. Die Herstellung transgener Pflanzen kann durch eine Reihe von Techniken erreicht werden (Übersicht: Potrykus I. and Spangenberg G. ed. (1995) *Gene transfer to plants*. Springer, Berlin). Vor allem der mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Gentransfer und die Beschießung  
35 von Pflanzenzellen mit der "Particle Gun" spielen hierbei eine wichtige Rolle. Ein wesentliches Problem ist die Tatsache, dass transgene DNA, sobald sie in einen Organismus stabil eingeführt wurden, nur schwer wieder zu entfernen ist. Die bei der Transformation zur Selektion verwendeten Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene werden in den transgenen Pflanzen belassen, was  
40 erheblich zu der mangelnden Akzeptanz dieser "Genfood" Produkte bei den Konsumenten beiträgt.

Es wird deshalb seit längerem versucht, Techniken zu entwickeln, mittels derer Fremd-DNA an spezifischen Stellen ins Pflanzengenom integriert bzw. wieder herausgeschnitten werden kann (Ow DW and Medberry SL (1995) Crit Rev in Plant Sci 14:239-261).

- 5  
Verschiedene Systeme zum gezielten Entfernen von transgen eingefügten Nukleinsäuresequenzen sind dem Fachmann bekannt. Sie basieren auf der Verwendung sequenzspezifischer Rekombinasen und zweier Erkennungssequenzen besagter Rekombinasen, die die zu entfernende Sequenz flankieren. Einwirkung der Rekombinase auf dieses Konstrukt führt zum Herausschneiden der flankierten Sequenz, wobei eine der Erkennungssequenzen im Genom des Organismus verbleibt. Verschiedene sequenzspezifische Rekombinationssysteme sind beschrieben wie das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1 (Dale EC und Ow DW (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:10558-10562; Russell SH et al. (1992) Mol Gen Genet 234: 49-59; Osborne BI et al. (1995) Plant J. 7, 687-701), das FLP/FRT System der Hefe (Kilby NJ et al. (1995) Plant J 8:637-652; Lyznik LA et al. (1996) Nucleic Acids Res 24:3784-3789), die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus E. coli oder das R/RS System des pSR1 Plasmids (Onouchi H et al. (1995) Mol. Gen. Genet. 247:653-660.; Sugita Ket al. (2000) Plant J. 22:461-469). Hier interagiert die Rekombinase (beispielsweise Cre oder FLP) spezifisch mit ihren jeweiligen Rekombinationssequenzen (34 bp lox-Sequenz bzw. 47 bp FRT-Sequenz), um die zwischengelagerten Sequenzen zu deletieren oder zu invertieren. Berichte über gelungene Anwendungen dieser Systeme in Pflanzen sind limitiert. So konnte die Gruppe von David Ow zeigen, dass ein für die Pflanzentransformation verwendeter Selektionsmarker, der von zwei lox Sequenzen umgeben war, durch Cre-Expression aus dem Pflanzengenom wieder herausgeschnitten werden kann (Dale EC und Ow DW (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:10558-10562). Ein Nachteil der sequenzspezifischen Rekombinationssysteme ist die Reversibilität der Reaktion, d.h. es herrscht ein Gleichgewicht zwischen Exzision und Integration des entsprechenden Markergens. Dies führt häufig dazu, dass Mutationen selektioniert werden, d.h. sobald eine Mutation die weitere Interaktion der lox-Erkennungssequenzen mit dem Enzym blockiert, wird das (ungewollte) Produkt dem Gleichgewicht entzogen und fixiert. Neben dem Cre-lox System trifft das auch auf die anderen sequenzspezifische Rekombinasen zu (s.o.). Nachteilig ist ferner die Tatsache, dass eine der Erkennungssequenzen der Rekombinase im Genom verbleibt, dieses also modifiziert wird. Dies kann Auswirkungen auf die Eigenschaften des Organismus haben, wenn beispielsweise durch die Erkennungssequenz Leseraster oder genetische Kontrollelemente wie Promotoren oder Enhancer verändert oder zerstört werden. Ferner schließt die im Genom verbleibende Erkennungssequenz eine weitere

## 3

Verwendung des Rekombinationsystems, beispielsweise für eine zweite genetische Modifikation, aus, da Wechselwirkungen mit den nachfolgend eingeführten Erkennungssequenzen nicht ausgeschlossen werden können. Größere Chromosomale Umlagerungen oder Deletionen 5 können die Folge sein.

Zubko et al. beschreiben ein System zur Deletion von Nukleinsäuresequenzen aus dem Genom von Tabak, wobei die zu deletierende Sequenz von zwei 352 bp langen attP Erkennungssequenzen des 10 Bakteriophagen Lambda flankiert ist. Die Deletion der flankierten Region erfolgt unabhängig von der Expression von Helferproteinen in zwei von elf transgene Tabaklinien durch spontane intrachromosomale Rekombination zwischen den attP Erkennungsregionen. Das Verfahren weist Nachteile dahingehend auf, als die Rekombination bzw. die Deletion nicht gezielt zu einem bestimmten Zeitpunkt induziert werden kann, sondern spontan erfolgt. Dass das 15 Verfahren nur bei einem kleinen Teil der Linien funktionierte, deutet darauf hin, dass in den betreffenden Fällen der jeweilige Integrationsloкус zur Instabilität neigt (Puchta H (2000) Trends 20 in Plant Sci 5:273-274).

WO 96/14408 beschreibt auf Seite 12 in der Legende zu Abbildung 32 ein Verfahren zur Entfernung eines genetischen Locus, bei dem je eine Erkennungssequenz der Homing-Restriktions- 25 endonuklease I-SceI an dem jeweiligen Ende der zu deletierenden Sequenz insertiert wird. Die Behandlung mit der Endonuklease führt hier zu Doppelstrangbrüchen an beiden Enden der zu deletierenden Sequenz. Die freien Enden verbinden sich dann durch "Rekombination". Die hier zitierte "Rekombination" kann 30 - wie auch aus der Abbildung ersichtlich - nur eine illegitime sein (beispielsweise ein "non-homologous end-joining" (NHEJ) Ereignis), da an den beiden verbleibenden Enden der genomischen DNA keine homologen Sequenzen vorhanden sind. Eine illegitime Rekombination führt jedoch zu unvorhersagbaren Rekombinations- 35 ereignissen. Dies kann Auswirkungen auf die Eigenschaften des Organismus haben, wenn dadurch beispielsweise Leseraster oder genetische Kontrollelemente wie Promotoren oder Enhancer verändert oder zerstört werden. Das System erfordert zwei 40 Erkennungssequenzen, die das zu deletierende Fragment flankieren.

Die Erzeugung sequenzspezifischer Doppelstrangbrüche mit Hilfe von Restriktionsenzymen in eukaryontischen Genomen, wie Hefe (Haber JE (1995) Bioassays 17:609-620), Säugerzellen (Jasin M (1996) Trends Genet. 12:224-228) oder Pflanzen (Puchta H (1999a) 45 Methods Mol Biol 113:447-451) ist beschrieben.



Beschrieben ist die Induktion einer intramolekularen Rekombination auf einer Plasmid DNA in *Xenopus* Oozyten durch sequenz-spezifische Spaltung mit der Endonuklease I-SceI (Segal DJ und Carroll D (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:806-810) oder durch  
5 synthetische, chimäre Nukleasen (Bibikova M et al. (2001) Mol Cell Biol 21(1):289-297). Ziel ist die gezielte Rekombination zwischen zwei homologen Sequenzen, zwischen denen eine entsprechende Nuklease-Schnittstelle lokalisiert ist. In beiden Fällen handelt es sich um extrachromosomale Rekombinations-  
10 ereignisse, bei denen jeweils nur ein Teil der extrachromosomalen Plasmid-DNA homolog rekombiniert.

Posfai et al. beschreiben ein Verfahren zum Austausch von Genen in dem Prokaryoten *E.coli* (Posfai G et al. (1999) Nucleic Acids  
15 Res 27(22):4409-4415). Dabei kommt es im *E.coli* Genom zu einer Rekombination zwischen dem endogenen und dem mutierten Gen, die durch einen Schnitt mit dem Restriktionsenzym I-SceI induziert wird. Ziel und Aufgabe war der Austausch eines endogenen Gens gegen ein mutiertes Transgen. Rekombinationen in *E.coli* verlaufen  
20 deutlich einfacher und mit höherer Effizienz als in höheren Eukaryonten (zum Beispiel beschrieben bei Kuzminov A (1999) Microbiol Mol Biol Rev. 63(4):751-813).

Dürrenberger et al. beschreiben die Induktion einer Rekombi-  
25 nation in Chloroplasten der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* unter Verwendung der I-SceI Homing-Endonuklease (Dürrenberger F et al. (1996) Nucleic Acid Res 24(17):3323-3331). Die Rekombination erfolgt zwischen dem endogenen 23S-Gen und einer insertierten 23S-cDNA, die eine I-SceI Schnittstelle ent-  
30 hält. Doppelstrangbrüche werden durch "Mating" des entsprechenden transgenen Organismus mit einem I-SceI exprimierenden Organismus induziert. Rekombinationen in Chloroplasten verlaufen deutlich einfacher und mit höherer Effizienz als in der chromosomalen DNA höheren Eukaryonten. So ist die homologe Rekombination an-  
35 scheinend sogar der bevorzugte, normale Weg der DNA Integration in Plastiden (Chloroplasten) (beschrieben bei: Heifetz PB und Tuttle AM (2001) Curr Opin Plant Biol 4:157-161). Plastiden haben anscheinend ein spezielles System, das ihnen homologe Rekombination im Unterschied zum Zellkern ermöglicht und die  
40 gezielte Einführung von Fremd-DNA erleichtert (Heifetz PB (2000) Biochimie 82:655-666).

Die "Gene Targeting" Technik, bei der eine gezielte Integration in die chromosomale DNA des Wirtsorganismus durch homologe  
45 Rekombination erreicht werden soll, funktioniert mit akzeptabler Effizienz nur bei Prokaryonten und Hefe. Die Erzeugung entsprechender transgener Organismen ist nur bei wenigen Spezies

(wie beispielsweise der Maus) und dort nur mit hohem Aufwand möglich (siehe auch Kanaar R Hoeijmakers JH (1997) Genes Funct 1(3):165-174). Die bestehende, geringen Effizienz der homologen Rekombination (ca.  $1:1 \times 10^6$ ) wird hier durch den Einsatz aufwendiger, ausgeklügelter und auf die jeweilige Spezies beschränkter Selektionstechniken (wie beispielsweise der "ES"-Zelltechnologie) kompensiert. In anderen Spezies - vor allem aber in höheren Pflanzen - sind derartige Technologien bis heute nicht etabliert (Mengiste T und Paszkowski J (1999) Biol. Chem. 380:749-758; Vergunst AC und Hooykaas PJJ (1999) Crit Rev Plant Sci 18:1-31; Puchta H (1999) Methods Mol Biol 113:447-451; Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323). Versuche bei Pflanzen eine homologe Rekombination zu erreichen, führen in den meisten Fällen zu zufälligen, nicht-homologen ("illegitimen") Insertionsereignissen. Dabei wird die eingebrachte DNA an einer oder mehreren vorher nicht bestimmbar Stellen im Pflanzengenom integriert. Die Integration erfolgt mittels illegitimer Rekombination (Roth DB und Wilson JH (1988) Illegitimate recombination in mammalian cells. In "Genetic recombination", R. Kucherlapati and G.R. Smith Edts., American Society of Microbiology, Washington, USA; S.621-635.) und nicht in Sequenzbereichen, die homolog zur transferierten DNA sind (Puchta H und Hohn B (1996) Trends Plant Sci. 1:340-348). Die Problematik der mangelnden Effizienz der homologen Rekombination, die vor allem bei Pflanzen gravierend ist, ist dem Fachmann allgemein bekannt. Die Ursachen sind Gegenstand aktueller Forschung (Übersichtsartikel: Mengiste T und Paszkowski J (1999) Biological Chemistry 380(7-8):749-58). Die Steigerung der Effizienz der homologen Rekombination ist ein lange bestehendes, bislang ungelöstes Bedürfnis in der Pflanzenbiotechnologie.

Eine weiteres, lange bestehendes Bedürfnis der biotechnologischen Forschung, das durch alle bislang etablierten Systeme nicht gelöst wird, ist die Bereitstellung von Systemen und Verfahren, die eine gezielte Entfernung von Nukleinsäuresequenzen aus der chromosomalen DNA eines eukaryotischen Organismus ermöglichen und eine mehrfache Anwendung auf den gleichen Organismus gestatten. Beispielsweise ist es ein Ziel der pflanzlichen Biotechnologie, bereits gezüchtete Hochleistungssorten mittels gentechnologischer Methoden weiter zu verbessern. Dabei ist es besonders wichtig, überschüssige Transgensequenzen wie Selektionsmarker nach der Transformation zu entfernen. Darüberhinaus böten Verfahren zur vorhersagbaren Eliminationen von Sequenzen beispielsweise aus der chromosomalen DNA eines Organismus weitere wissenschaftlich und wirtschaftlich hochinteressante Anwendungen im Bereich des "genetic engeneering".

Es stellte sich also die Aufgabe, Systeme und Verfahren zu entwickeln, die eine vorhersagbare Elimination definierter Nukleinsäuresequenzen aus der chromosomalen DNA eines eukaryotischen Organismus ermöglichen und eine mehrfache, sukzessive Anwendung auf den gleichen Organismus gestatten.

Diese Aufgabe wurde durch Bereitstellung des erfindungsgemäßen Rekombinationssystems in überraschender Weise gelöst.

10 Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft ein Rekombinationssystem zum Entfernen einer DNA-Sequenz aus der chromosomalen DNA einer eukaryotischen Zelle oder Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass

15 I) ein transgenes Rekombinationskonstrukt insertiert in die chromosomale DNA eines eukaryotischen Organismus, das eine Sequenz enthält bestehend in 5'/3'-Richtung aus

a1) einer ersten Homologiesequenz A und

20

b1) mindestens eine Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und

25

a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologiesequenzen A und B eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten,

und

30

II) ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz (b1) zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen oder eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz (b1)

35

in einer eukaryotischen Zelle oder Organismus zusammen vorliegen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zum Entfernen einer DNA-Sequenz aus der chromosomalen DNA einer eukaryotischen Zelle oder Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass

I) ein transgenes Rekombinationskonstrukt insertiert in die chromosomale DNA eines eukaryotischen Organismus, das eine Sequenz enthält bestehend in 5'/3'-Richtung aus

45

7

a1) einer ersten Homologiesequenz A und

b1) mindestens eine Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und

5

a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologiesequenzen A und B eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten,

10

und

II) ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz (b1) zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

15

in einer eukaryotischen Zelle oder Organismus zusammengebracht werden, und die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie die homologe Rekombination zwischen den Homologiesequenzen A und B erfolgt.

20

Die Erfindung ermöglicht es, aus der chromosomalen DNA eines Organismus Sequenzen (beispielsweise Selektionsmarker wie Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene) in einer exakt vorhersagbaren Weise zu deletieren. Dabei wird die zu eliminierende Sequenz mit Erkennungssequenzen zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (beispielsweise Erkennungssequenzen von selten-schneidenden Restriktionsenzymen) flankiert und mit homologen Sequenzen im Bereich der Schnittstellen kombiniert. Die Induktion eines Doppelstrangbruchs erfolgt durch ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (beispielsweise einer sequenzspezifischen Nuklease), was infolge die homologe Rekombination von am Bruch gelegenen homologer Sequenzen und damit Deletion etwaiger zwischen den Sequenzen lokalisierten Nukleinsäuresequenzen auslöst. Die Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wird dabei ebenfalls deletiert, wodurch das Verfahren für weitere kontrollierte genetische Veränderungen wiederholt verwendet werden kann.

30

35

40

Überraschenderweise erfolgt diese induzierte, homologe Rekombination im Kontrast zu den bisherigen Erfahrungen auf dem Gebiet der homologen Rekombination - auch bei Pflanzen - mit hoher Effizienz und Präzision. Die Häufigkeit ist mit der der parallelen nicht-homologen Ereignisse (zum Beispiel "non-

45

homologous end-joining" Ereignisse) vergleichbar (vgl. Beispiel 5). Dies ist ein bemerkenswerter Befund, der im Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen steht, wonach die homologe Rekombination - vor allem bei Pflanzen - eine untergeordnete, 5 fast zu vernachlässigende Häufigkeit im Vergleich zu den "illegitimen" Ereignissen hat:

Deletiert werden die zwischen den Homologiesequenzen A und B lokalisierten Sequenzen. Im Unterschied zu Systemen wie beispielsweise dem cre/lox- oder FRT/FLP-System ist man für die 10 Rekombination nicht an bestimmte Sequenzen gebunden. Dem Fachmann ist bekannt, dass jede Sequenz mit einer anderen homolog rekombinieren kann, wenn eine ausreichende Länge und Homologie vorliegt. Durch die sequenzspezifische Induktion der Doppelstrangbrüche 15 wird die Effizienz der homologen Rekombination zwischen den Homologiesequenzen A und B erheblich gesteigert, wenn nicht gar erst ermöglicht.

"Transgen" meint in Bezug auf das Rekombinationskonstrukt 20 alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommene Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) mindestens eine der Homologiesequenzen A oder B, oder
- 25 b) mindestens eine Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, oder
- c) (a) und (b)

30 sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung (beispielsweise an ihrem natürlichen chromosomalen Locus) befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft Substitutionen, Additionen, Deletionen, 35 Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste umfassen kann.

"Eukaryotischen Zelle oder Organismus" meint allgemein jede eukaryotische Zelle oder Organismus sowie von diesen abgeleitete 40 Zellen, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte), in denen bei gleichzeitigem Vorliegen des Rekombinationskonstruktes und des Enzyms geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in einem Reaktionsraum 45 (beispielsweise einer Zelle oder einem Kompartiment derselben) eine Induktion von Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie die

## 9

homologe Rekombination zwischen den Homologiesequenzen A und B erfolgen kann. Umfasst sind in einer besonders bevorzugten Ausführungsform Kompartimente einer eukaryotischen Zelle, wie beispielsweise der Zellkern.

5

Besonders bevorzugt umfasst sind solche Zellen oder Organismen, die einen mehrzelligen eukaryotischen Organismus darstellen oder von diesem abgeleitet sind, sowie Zellen, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) derselben. Ganz besonders

- 10 bevorzugt umfasst sind solche Zellen oder Organismen, die einen tierischen oder pflanzlichen Organismus darstellen oder von diesem abgeleitet sind, sowie Zellen, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut derselben. Am meisten bevorzugt umfasst sind solche Zellen oder Organismen, die einen pflanzlichen Organismus dar-
- 15 stellen oder von diesem abgeleitet sind sowie Zellen, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut derselben. Bevorzugte Gattungen und Arten sind weiter unten aufgeführt.

"Ausreichende Länge" meint in Bezug auf die Homologiesequenzen A

- 20 und B bevorzugt Sequenzen von einer Länge von mindestens 20 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 50 Basenpaaren, besonders bevorzugt von mindestens 100 Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt von mindestens 250 Basenpaaren, am meistens bevorzugt von mindestens 500 Basenpaaren.

25

"Ausreichende Homologie" meint in Bezug auf die Homologiesequenzen A und B bevorzugt Sequenzen die eine Homologie innerhalb dieser Homologiesequenzen aufweisen von mindestens 70 %, bevorzugt 80 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevor-

- 30 zugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 99 %, am meisten bevorzugt 100% über eine Länge von von mindestens 20 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 50 Basenpaaren, besonders bevorzugt von mindestens 100 Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt von mindestens 250 Basenpaaren, am meistens bevorzugt von
- 35 mindestens 500 Basenpaaren.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus

- 40 GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 12

Length Weight: 4

45

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

## 10

In einer bevorzugten Ausführungsform ist zwischen den Homologie-sequenzen A und B nur eine Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen lokalisiert, so dass das in dem erfindungsgemäßen Rekombinationssystem bzw. Verfahren 5 zum Einsatz kommende Rekombinationskonstrukt wie folgt in 5'/3'-Richtung aufgebaut ist aus

- a1) einer ersten Homologiesequenz A und
- 10 b1) einer Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und
- a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologie-sequenzen A und B eine ausreichende Länge und aus-  
15 reichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist zwischen den Homologie-sequenzen A und B eine weitere Nukleinsäuresequenz lokalisiert, 20 so dass das in dem erfindungsgemäßen Rekombinationssystem bzw. Verfahren zum Einsatz kommende Rekombinationskonstrukt wie folgt in 5'/3'-Richtung aufgebaut ist aus

- a1) einer ersten Homologiesequenz A und
- 25 b1) einer Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und
- c) einer weiteren Nukleinsäuresequenz und
- 30 a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologie-sequenzen A und B eine ausreichende Länge und aus- reichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten.

35 Die Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen kann auch hinter oder in der weiteren Nukleinsäuresequenz lokalisiert sein.

40 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist hinter die weitere Nukleinsäuresequenz eine zweite Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von Doppelstrangbrüchen vorhanden. Vor allem bei weiter auseinanderliegenden Homologiesequenzen A und B bzw. längeren weiteren Nukleinsäuresequenzen ist diese Ausführungsform 45 vorteilhaft, da die Effizienz der Rekombination gesteigert wird. Das in dem erfindungsgemäßen Rekombinationssystem bzw. Verfahren

## 11

zum Einsatz kommende Rekombinationskonstrukt ist nach dieser Ausführungsform wie folgt in 5'/3'-Richtung aufgebaut aus

- 5 a1) einer ersten Homologiesequenz A und
- b1) einer ersten Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und
- 10 c) einer weiteren Nukleinsäuresequenz und
- b2) einer zweiten Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und
- 15 a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologiesequenzen A und B eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten.

Ferner können neben der zweiten Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen noch weitere Erkennungssequenzen zwischen den Homologiesequenzen A und B vorhanden sein. Die einzelnen Erkennungssequenzen (zum Beispiel b1 oder b2) zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen können identisch oder unterschiedlich sein, d.h. sie können als Erkennungssequenz für ein einzelnes Enzym zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen fungieren oder auch für verschiedene. Dabei ist die Ausführungsform bevorzugt, bei der die Erkennungssequenzen zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen als Erkennungssequenz für ein einzelnes Enzym zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen fungieren.

Dem Fachmann sind verschiedene Wege bekannt, um zu einem der erfindungsgemäßen Rekombinationskonstrukte zu gelangen. Die Herstellung kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Rekombinationskonstrukt durch Aneinanderfügung der oben aufgeführten wesentlichen Bestandteile des Rekombinationskonstrukts in der genannten Reihenfolge unter Verwendung dem Fachmann geläufiger Rekombinations-



und Klonierungstechniken hergestellt und dann in die chromosomale DNA eines Wirtsorganismus eingeführt.

- Dem Fachmann ist jedoch bewusst, dass er zu dem erfindungsgemäßen  
5 Rekombinationskonstrukt auch auf andere Weise gelangen kann.  
So kann der Wirtsorganismus bereits eines oder mehr der wesentlichen Bestandteile des Rekombinationskonstruktes enthalten.  
Das erfindungsgemäße Rekombinationskonstrukt wird dann durch Einführung eines weiteren oder mehr der wesentlichen Bestandteile  
10 des Rekombinationskonstruktes in der richtigen Position zu den bereits vorhandenen Bestandteilen in dem besagten Organismus erzeugt. So kann beispielsweise der Ausgangsorganismus bereits eine der Homologiesequenzen A oder B enthalten. Enthält der Organismus bereits eine Homologiesequenz A, so entsteht durch  
15 Einführung eines Konstruktes bestehend aus einer Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und einer zweiten Homologiesequenz B hinter die Homologiesequenz A eines der erfindungsgemäßen Rekombinationskonstrukte.
- 20 Ferner sind dem Fachmann verschiedene Wege bekannt, wie das erfindungsgemäße Rekombinationskonstrukt in die chromosomale DNA eines eukaryotischen Zelle oder Organismus eingeführt werden kann. Dabei kann die Insertion gerichtet (d.h. an einem definierten Insertionsort) oder ungerichtet (d.h. zufällig) erfolgen.
- 25 Entsprechende Techniken sind dem Fachmann bekannt und weiter unten beispielhaft beschrieben.

"Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrang-  
30 brüchen" (infolge "DSBI-Enzym" für "double strand-break inducing enzyme") meint allgemein all solche Enzyme, die in der Lage sind, sequenzspezifisch Doppelstrangbrüche in doppelsträngige DNA zu erzeugen. Beispielsweise aber nicht einschränkend seien zu nennen:

35

1. Restriktionsendonukleasen (Typ II) bevorzugt Homing-Endonukleasen wie weiter unten im Detail beschrieben.
2. Rekombinasen (wie beispielsweise Cre/lox; R-RS; FLP/FTR  
40 wie oben beschrieben)
3. Transposasen zum Beispiel die P-Element Transposase (Kaufman PD und Rio DC (1992) Cell 69(1):27-39) oder AcDs (Xiao YL und Peterson T (2000) Mol Gen Genet 263(1):22-29). Im Prinzip  
45 sind alle Transposasen oder Integrasen geeignet, solange sie eine Sequenzspezifität haben (Haren L et al. (1999) Annu Rev

## 13

Microbiol. 1999;53:245-281; Beall EL, Rio DC (1997) Genes Dev. 11(16):2137-2151).

4. Chimäre Nukleasen wie weiter unten im Detail beschrieben.
- 5
5. Enzyme die im Immunsystem Doppelstrangbrüche induzieren wie das RAG1/RAG2 System (Agrawal A et al. (1998) Nature 394(6695):744-451).
- 10 6. Gruppe II Intron Endonukleasen. Durch Modifikationen der Intronsequenz können Gruppe II Introns zu einer nahezu beliebigen Sequenz in einer Doppelstrang-DNA dirigiert werden. In diese können die Gruppe II Introns dann mittels eines reversen Spleißmechanismus inserieren (Mohr et al. (2000) Genes & Development 14:559-573; Guo et al. (2000) Science 289:452- 457). Während dieses reversen Spleißmechanismus wird in die Ziel-DNA ein Doppelstrangbruch eingeführt, wobei die ausgeschnittene Intron-RNA den Sinn-Strang spaltet, während der Proteinanteil der Gruppe II Intron Endonuklease denn Gegensinn-Strang hydrolysiert (Guo et al. (1997) EMBO J 16: 6835- 6848). Will man wie in der vorliegenden Erfindung lediglich den Doppelstrangbruch induzieren und kein vollständiges reverses Spleißen erzielen, kann man zum Beispiel Gruppe II Intron Endonukleasen
- 20 benutzen, denen die reverse Transkriptaseaktivität fehlt. Dadurch wird nicht das Erzeugen des Doppelstrangbruches verhindert, aber der reverse Spleißmechanismus kann nicht vollständig ablaufen.
- 25
- 30 Sowohl natürliche als auch künstlich hergestellte Enzyme sind geeignet.
- Bevorzugt sind all solche DSB1-Enzyme, deren Erkennungssequenz bekannt ist und die entweder in Form ihrer Proteine (beispiels-
- 35 weise durch Aufreinigung) gewonnen oder unter Verwendung ihrer Nukleinsäuresequenz expremiert werden können.
- Besonders bevorzugt sind Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme), die keine oder nur wenige Erkennungssequenzen - neben
- 40 den im transgenen Rekombinationskonstrukt vorhandenen Erkennungssequenzen - in der chromosomalen DNA-Sequenz eines bestimmten, eukaryotischen Organismus haben. Dies vermeidet weitere Doppelstrangbrüche an unerwünschten Loci im Genom.
- 45 Ganz besonders bevorzugt sind deshalb Homing-Endonukleasen (Übersicht: (Belfort M und Roberts RJ (1997) Nucleic Acids Res 25: 3379-3388; Jasin M (1996) Trends Genet. 12:224-228; Internet:

<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.homing.html>). Diese haben aufgrund ihrer langen Erkennungssequenzen meist keine oder nur wenige weitere Erkennungssequenzen in der chromosomalen DNA eukaryotischer Organismen.

5

- Die für derartige Homing-Endonukleasen kodierenden Sequenzen können beispielsweise aus dem Chloroplastengenom von *Chlamydomonas* isoliert werden (Turmel M et al. (1993) J Mol Biol 232: 446-467). Sie sind klein (18 bis 26 kD), weisen in ihrem offenen
- 10 Leseraster (ORF) eine "coding usage" auf, die direkt für nukleäre Expression in Eukaryonten (Monnat RJ Jr et al. (1999) Biochem Biophys Res Com 255:88-93) geeignet ist. Ganz besonders bevorzugt sind die Homing-Endonukleasen I-SceI (WO96/14408), I-SceII (Sarguiel B et al. (1990) Nucleic Acids Res 18:5659-5665),
- 15 I-SceIII (Sarguiel B et al. (1991) Mol Gen Genet. 255:340-341), I-CeuI (Marshall (1991) Gene 104:241-245), I-CreI (Wang J et al. (1997) Nucleic Acids Res 25: 3767-3776), I-ChuI (Cote V et al. (1993) Gene 129:69-76), I-TevI (Chu et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:3574-3578; Bell-Pedersen et al. (1990) Nucleic
- 20 Acids Res 18:3763-3770), I-TevII (Bell-Pedersen et al. (1990) Nucleic Acids Res 18:3763-3770), I-TevIII (Eddy et al. (1991) Genes Dev. 5:1032-1041), Endo SceI (Kawasaki et al. (1991) J Biol Chem 266:5342-5347), I-CpaI (Turmel M et al. (1995a) Nucleic Acids Res 23:2519-2525) und I-CpaII (Turmel M et al. (1995b) Mol.
- 25 Biol. Evol. 12, 533-545) isoliert.

Weitere Homing-Endonukleasen sind unter der oben angegebenen Internet-Adresse aufgeführt, zu nennen sind beispielsweise Homing-Endonukleasen wie F-SceI, F-SceII, F-SuvI, F-TevI,

- 30 F-TevII, I-AmaI, I-AniI, I-CeuI, I-CeuAIIP, I-ChuI, I-CmoEI, I-CpaI, I-CpaII, I-CreI, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIVP, I-CsmI, I-CvuI, I-CvuAIP, I-DdiI, I-DdiII, I-DirI, I-DmoI, I-HmuI, I-HmuII, I-HspNIP, I-LlaI, I-MsoI, I-NaaI, I-NanI, I-NclIP, I-NgrIP, I-NitI, I-NjaI, I-Nsp236IP, I-PaKI,
- 35 I-PboIP, I-PcuIP, I-PcuAI, I-PcuVI, I-PgrIP, I-PobIP, I-PorI, I-PorIIP, I-PpbIP, I-PpoI, I-SPBetaIP, I-ScaI, I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SceVI, I-SceVII, I-SexIP, I-SneIP, I-SpomCP, I-SpomIP, I-SpomIIP, I-SquIP, I-Ssp6803I, I-SthPhiJP, I-SthPhiST3P, I-SthPhiS3bP, I-TdeIP, I-TevI, I-TevII, I-TevIII,
- 40 I-UarAP, I-UarHGPA1P, I-UarHGPA13P, I-VinIP, I-ZbiIP, PI-MtuI, PI-MtuHIP, PI-MtuHIIP, PI-PfuI, PI-PfuII, PI-PkoI, PI-PkoII, PI-PspI, PI-Rma43812IP, PI-SPBetaIP, PI-SceI, PI-TfuI, PI-TfuII, PI-ThyI, PI-TliI, PI-TliII.
- 45 Bevorzugt sind dabei die Homing-Endonukleasen, deren Gensequenzen bereits bekannt sind, wie beispielsweise F-SceI, I-CeuI, I-ChuI, I-DmoI, I-CpaI, I-CpaII, I-CreI, I-CsmI, F-TevI, F-TevII, I-TevI,

## 15

I-TevII, I-AniI, I-CvuI, I-DdiI, I-HmuI, I-HmuII, I-LlaI,  
 I-NanI, I-MsoI, I-NitI, I-NjaI, I-PakI, I-PorI, I-PpoI, I-ScaI,  
 I-Ssp6803I, PI-PkoI, PI-PkoII, PI-PspI, PI-TfuI, PI-TliI.

- 5 Ganz besonders bevorzugt sind kommerziell erhältliche Homing-  
 Endonukleasen wie I-CeuI, I-SceI, I-DmoI, I-PpoI, PI-PspI oder  
 PI-SceI.

Die Enzyme können in der dem Fachmann geläufigen Art und Weise  
 10 aus ihren Herkunftsorganismen aufgereinigt und/oder die für sie  
 kodierende Nukleinsäuresequenz kloniert werden. Die Sequenzen  
 verschiedener Enzyme sind in der GenBank hinterlegt.

- Ganz besonders bevorzugt sind die Homing-Endonukleasen I-SceI,  
 15 I-CpaI, I-CpaII, I-CreI und I-ChuI. Am meisten bevorzugt sind  
 die Homing-Endonukleasen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 oder 10.

Als künstliche DSBI-Enzyme seien beispielhaft chimäre Nukleasen  
 zu nennen, die sich aus einer unspezifischen Nukleasedomäne und  
 20 einer sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne bestehend aus Zink-  
 fingern zusammensetzen (Bibikova M et al. (2001) Mol Cell Biol.  
 21:289-297). Diese DNA-bindenden Zinkfingerdomänen können an jede  
 beliebige DNA-Sequenz angepasst werden. Entsprechende Verfahren  
 zur Herstellung entsprechender Zinkfingerdomänen sind beschrieben  
 25 und dem Fachmann bekannt (Beerli RR et al., Proc Natl Acad Sci U  
 S A. 2000; 97 (4):1495-1500; Beerli RR, et al., J Biol Chem 2000;  
 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd., Curr Opin Chem  
 Biol 2000; 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS, J Biol Chem 2000;  
 275(12):8742-8748; Beerli RR et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998;  
 30 95(25):14628-14633; Kim JS et al., Proc Natl Acad Sci USA 1997;  
 94(8):3616-3620; Klug A, J Mol Biol 1999; 293(2):215-218; Tsai SY  
 et al., Adv Drug Deliv Rev 1998;30(1-3):23-31; Mapp AK et al.,  
 Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(8):3930-3935; Sharrocks AD  
 et al., Int J Biochem Cell Biol 1997; 29(12):1371-1387; Zhang L  
 35 et al., J Biol Chem 2000; 275(43):33850-33860).

Bevorzugt wird das DSBI-Enzym als Fusionsprotein mit einer  
 Kernlokalisationssequenz (NLS) exprimiert. Diese NLS-Sequenz  
 ermöglicht einen erleichterten Transport in den Kern und  
 40 steigert die Effizienz des Rekombinationssystems. Verschiedene  
 NLS-Sequenzen sind dem Fachmann bekannt und unter anderem be-  
 schrieben bei Jicks GR und Raikhel NV (1995) Annu. Rev. Cell  
 Biol. 11:155-188. Bevorzugt für pflanzliche Organismen ist  
 beispielsweise die NLS-Sequenz des SV40 "large antigen". Ganz  
 45 besonders bevorzugt sind die nachfolgenden NLS-Sequenzen:

## 16

NLS1: N-Pro-Lys-Thr-Lys-Arg-Lys-Val-C (SEQ ID NO: 29)

NLS2: N-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-C (SEQ ID NO: 30)

- 5 Die in den Ausführungsbeispielen verwendeten Homing-Endonukleasen gemäß SEQ ID NO: 4, 6, 8 oder 10 stellen Fusionsproteine aus den nativen Nukleasen und der NLS2 Kernlokalisationssequenz dar.

Aufgrund der geringen Größe vieler DSBI-Enzyme (wie beispielsweise der Homing-Endonukleasen) ist jedoch eine NLS-Sequenz nicht zwingend erforderlich. Diese Enzyme können die Kernporen auch ohne die Unterstützung passieren. Belegt wird dies durch die Effizienz der verwendeten Homing-Endonuklease gemäß SEQ ID NO: 2, die keine Kernlokalisationssequenz umfasst.

15

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Aktivität des DSBI-Enzyms induziert werden. Entsprechende Verfahren sind für sequenzspezifische Rekombinasen beschrieben (Angrand PO et al. (1998) Nucl. Acids Res. 26(13):3263-3269; Logie C und Stewart AF (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92(13):5940-5944; Imai T et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(1):224-228). Bei diesen Verfahren werden Fusionsproteine aus dem DSBI-Enzym und der Ligandenbindedomäne eines Steroidhormonrezeptors (z.B. des humanen Androgenrezeptors, oder mutierte Varianten des humanen Estrogenrezeptors wie dort beschrieben) eingesetzt. Die Induktion kann mit Liganden wie beispielsweise Estradiol, Dexamethason, 4-Hydroxytamoxifen oder Raloxifen erfolgen.

- Manche DSBI-Enzyme sind als Dimer (Homo- oder Heterodimer) aktiv (I-CreI bildet ein Homodimer; I-SecIV bildet ein Heterodimer (Wernette CM (1998) Biochemical & Biophysical Research Communications 248(1):127-333)). Eine Dimerisierung kann induzierbar gestaltet werden, indem beispielsweise die natürlichen Dimerisierungsdomänen gegen die Bindungsdomäne eines niedermolekularen Liganden ausgetauscht werden. Zugabe eines dimeren Liganden bewirkt dann Dimerisierung des Fusionsproteins. Entsprechende induzierbare Dimerisierungsverfahren als auch die Herstellung der dimeren Liganden sind beschrieben (Amara JF et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(20): 10618-10623; Muthuswamy SK et al. (1999) Mol Cell Biol 19(10):6845-685; Schultz LW und Clardy J (1998) Bioorg Med Chem Lett. 8(1):1-6; Keenan T et al. (1998) Bioorg Med Chem. 6(8):1309-1335).

- "Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen" meint allgemein solche Sequenzen, die unter den Bedingungen in der jeweils verwendeten eukaryotischen Zelle oder Organismus die Erkennung und Spaltung durch das DSBI-Enzym

erlauben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien dabei in nachfolgender Tabelle 1 die Erkennungssequenzen für die jeweiligen aufgeführten DSBI-Enzyme genannt.

5 Tabelle 1: Erkennungssequenzen und Herkunftsorganismus von DSBI-Enzymen ("^" gibt innerhalb einer Erkennungssequenz die Schnittstelle des DSBI-Enzyms an.)

10	DSBI-Enzym	Herkunftsorganismus	Erkennungssequenz
	CRE	Bacteriophage P1	5'-AACTCTCATCGCTTCGGATAACTTCCTGTTATCCGAAACAT ATCACTCACTTTGGTGATTTCACCGTAACTGTCTATGATTAATG -3'
15	FLP	Saccharomyces cerevisiae	5'-GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTA- TAGGAAC TTC-3'
	R	pSR1 Plasmids	5'-CGAGATCATATCACTGTGGACGTTGATGAAAGAATACGTTA TTCTTTCATCAAATCGT
20	P-Element Transposase	Drosophila	5'-CTAGATGAAATAACATAAGGTGG
	I-AniI	Aspergillus nidulans	5'-TTGAGGAGGTT^TCTCTGTAAATAANNNNNNNNNNNNNNNNN 3'-AACTCCTCCAAAGAGACATTATNNNNNNNNNNNNNNNNNN^
	I-DdiI	Dictyostelium discoideum AX3	5'-TTTTTTGGTTCATCCAGAAGTATAT 3'-AAAAAACCAG^TAGGTC^TTCATATA
25	I-CvuI	Chlorella vulgaris	5'-CTGGGTTCAAACGTCGTGA^GACAGTTTGG 3'-GACCCAAGTTTTGCAG^CACTCTGTCAAACC
	I-CsmI	Chlamydomonas smithii	5'-GTACTAGCATGGGGTCAAATGCTTTCTGG
	I-CmoEI	Chlamydomonas moewusii	5'-TCGTAGCAGCT^CACGGTT 3'-AGCATCG^TCGAGTGCCAA
30	I-CreI	Chlamydomonas reinhardtii	5'-CTGGGTTCAAACGTCGTGA^GACAGTTTGG 3'-GACCCAAGTTTTGCAG^CACTCTGTCAAACC
	I-ChuI	Chlamydomonas humicola	5'-GAAGGTTTGGCACCTCG^ATGTCGGCTCATC 3'-CTTCCAAACCGTG^GAGCTACAGCCGAGTAG
35	I-CpaI	Chlamydomonas pallidostigmatica	5'-CGATCCTAAGGTAGCGAA^ATTCA 3'-GCTAGGATTCCATC^GCTTTAAGT
	I-CpaII	Chlamydomonas pallidostigmatica	5'-CCCGGCTAACTC^TGTGCCAG 3'-GGGCCGAT^TGAGACACGGTC
40	I-CeuI	Chlamydomonas eugametos	5'-CGTAACATAACGGTCCTAA^GGTAGCGAA 3'-GCATTGATATTGCCAG^GATTCCATCGCTT
	I-DmoI	Desulfurococcus mobilis	5'-ATGCCTTGCCGGGTAA^GTTCCGGCGCGCAT 3'-TACGGAACGCC^CATTC AAGGCCGCGCGTA
45	I-SceI	S. cerevisiae	5'-AGTTACGCTAGGATAA^CAGGGTAATATAG 3'-TCAATGCGATCCC^TATTGTCCCATTTATATC 5'-TAGGGATAA^CAGGGTAAT 3'-ATCCC^TATTGTCCCATTA ("Core"-Sequenz)

	DSBI-Enzym	Herkunftsorganismus	Erkennungssequenz
5	I-SceII	S.cerevisiae	5'-TTTTGATTCTTTGGTCACCC^TGAAGTATA 3'-AAAAC TAAGAAACCAG^TGGGACTTCATAT
	I-SceIII	S.cerevisiae	5'-ATTGGAGGT TTTGGTAAC^TATTTATTACC 3'-TAACCTCCAAAACC^ATTGATAAATAATGG
	I-SceIV	S.cerevisiae	5'-TCTTTTCTCTTGATTA^GCCCTAATCTACG 3'-AGAAAAGAGAAC^TAATCGGGATTAGATGC
	I-SceV	S.cerevisiae	5'-AATAATTTTCT^TCTTAGTAATGCC 3'-TTATTAAAAAGAAGATCATTA^CGG
10	I-SceVI	S.cerevisiae	5'-GTTATTTTAATG^TTT TAGTAGTTGG 3'-CAATAAATTACAAAATCATCA^ACC
	I-SceVII	S.cerevisiae	5'-TGT CACATT GAGGTGCACTAGTTATTAC
	PI-SceI	S.cerevisiae	5'-ATCTATGTCGGGTGC^GGAGAAAGAGGTAAT 3'-TAGATACAGCC^CACGCCTCTTTCTCCATTA
15	F-SceI	S.cerevisiae	5'-GATGCTGTAGGC^ATAGGCTTGGTT 3'-CTACGACA^TCCGTATCCGAACCAA
	F-SceII	S.cerevisiae	5'-CTTTCCGCAACA^GTAA AATT 3'-GAAAGGCG^TTGTCATTTTAA
20	I-HmuI	Bacillus subtilis bacteriophage SP01	5'-AGTAATGAGCCTAACGCTCAGCAA 3'-TCATTACTCGGATTGC^GAGTCGTT
	I-HmuII	Bacillus subtilis bacteriophage SP82	5'-AGTAATGAGCCTAACGCTCAACAANNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
25	I-LlaI	Lactococcus lactis	5'-CACATCCATAAC^CATATCATTTTT 3'-GTGTAGGTATTGGTATAGTAA^AAA
	I-MsoI	Monomastix species	5'-CTGGGTTC AAAACGTCGTGA^GACAGTTTGG 3'-GACCCAAGTTTTCGAG^CACTCTGTCAAACC
30	I-NanI	Naegleria andersoni	5'-AAGTCTGGTGCCA^GCACCCGC 3'-TTCAGACC^ACGGTCGTGGGCG
	I-NitI	Naegleria italica	5'-AAGTCTGGTGCCA^GCACCCGC 3'-TTCAGACC^ACGGTCGTGGGCG
	I-NjaI	Naegleria jamiesoni	5'-AAGTCTGGTGCCA^GCACCCGC 3'-TTCAGACC^ACGGTCGTGGGCG
35	I-PakI	Pseudendoclonium akinetum	5'-CTGGGTTC AAAACGTCGTGA^GACAGTTTGG 3'-GACCCAAGTTTTCGAG^CACTCTGTCAAACC
	I-PorI	Pyrobaculum organotrophum	5'-GCGAGCCC GT AAGGTT^GTGTACGGG 3'-CGCTCGGGCATT^CCCACACATGCCC
	I PpeI	Physarum polycyphalum	5'-TAACTATGACTCTCTTAA^GGTAGCCAAAT 3'-ATTGATACTGAGAG^AATTC CATCGGTTTA
40	I-ScaI	Saccharomyces capensis	5'-TGT CACATT GAGGTGCACT^AGTTATTAC 3'-ACAGTGTAACTCCAC^GTGATCAATAATG
	I-Ssp6803I	Synechocystis species	5'-GTCGGGCT^CATAACCCGAA 3'-CAGCCCCGAGTA^TTGGGCTT
	PI-PfuI	Pyrococcus furiosus Vcl	5'-GAAGATGGGAGGAGGG^ACCGGACTCAACTT 3'-CTTCTACCCTCC^TCCTGGCCTGAGTTGAA
45	PI-PfuII	Pyrococcus furiosus Vcl	5'-ACGAATCCATGTGGAGA^AGAGCCTCTATA 3'-TGCTTAGGTACAC^CTCTCTCGGAGATAT

DSBI-Enzym	Herkunfts- organismus	Erkennungssequenz
5 PI-PkoI	Pyrococcus kodakaraensis KOD1	5'-GATTTTAGAT^CCCTGTACC 3'-CTAAAA^TCTAGGGACATGG
PI-PkoII	Pyrococcus kodakaraensis KOD1	5'-CAGTACTACG^GTTAC 3'-GTCATG^ATGCCAATG
10 PI-PspI	Pyrococcus sp.	5'-AAAATCCTGGCAAACAGCTATTAT^GGGTAT 3'-TTTTAGGACCGTTTGTTCGAT^AATACCCATA
10 PI-TfuI	Thermococcus fumicolans ST557	5'-TAGATTTTtaggt^CGCTATATCCTTCC 3'-ATCTAAAA^TCCAGCGATATAGGAAGG
15 PI-TfuII	Thermococcus fumicolans ST557	5'-TAYGCNGAYACN^GACGGYTTYT 3'-ATRCGNCT^RTGNCTGCCRAARA
15 PI-ThyI	Thermococcus hydrotherma- lis	5'-TAYGCNGAYACN^GACGGYTTYT 3'-ATRCGNCT^RTGNCTGCCRAARA
PI-TliI	Thermococcus litoralis	5'-TAYGCNGAYACNGACGG^YTTYT 3'-ATRCGNCTRTGNC^TGCCRAARA
20 PI-TliII	Thermococcus litoralis	5'-AAATTGCTTGCAAACAGCTATTACGGCTAT
I-TevI	Bacteriophage T4	5'-AGTGGTATCAAC^GCTCAGTAGATG 3'-TCACCATAGT^TGCGAGTCATCTAC
I-TevII	Bacteriophage T4	5'-GCTTATGAGTATGAAGTGAACACGT^TATTC 3'-CGAATACTCATACTTCACTTGTG^CAATAAG
25 F-TevI	Bacteriophage T4	5'-GAAACACAAGA^AATGTTTAGTAAANNNNNNNNNNNNNNN 3'-CTTTGTGTTCTTTACAAATCATTTNNNNNNNNNNNNNNNN^
F-TevII	Bacteriophage T4	5'-TTTAATCCTCGCTTC^AGATATGGCAACTG 3'-AAATTAGGAGCGA^AGTCTATACCGTTGAC

30 Dabei sind auch kleinere Abweichungen (Degenerationen) der Erkennungssequenz umfasst, die dennoch eine Erkennung und Spaltung durch das jeweilige DSBI-Enzym ermöglichen. Derartige Abweichungen - auch in Zusammenhang mit unterschiedlichen Rahmenbedingungen wie beispielsweise Calcium oder Magnesium-Konzentration - sind beschrieben (Argast GM et al. (1998) J Mol Biol 35 280: 345-353). Ferner sind Kernsequenzen ("Core"-Sequenzen) dieser Erkennungssequenzen umfasst. Es ist bekannt, dass auch die inneren Anteile der Erkennungssequenzen für einen induzierten Doppelstrangbruch genügen und das die äußeren nicht unbedingt relevant sind, jedoch die Effizienz der Spaltung mitbestimmen können. So kann beispielsweise für I-SceI eine 40 18bp-"Core"-Sequenz definiert werden.

Die Zusammenführung von Rekombinationskonstrukt und DSBI-Enzym zu einem der erfindungsgemäßen Rekombinationssystemen bzw. Verfahren 45 kann auf verschiedene dem Fachmann geläufige Weisen realisiert werden. So können die Rekombinationskonstrukte und das DSBI-Enzym



beispielsweise folgender Maßen in einem Organismus, einer Zelle, Zellkompartiment oder einem Gewebe zusammengebracht werden:

- 1.) Es werden auf dem üblichen Weg Organismen hergestellt, die  
5 die Rekombinationskassette in die chromosomale DNA insertiert  
tragen. Beispielsweise können entsprechende Pflanzen bevor-  
zugt durch Agrobakterien-vermittelte Transformation her-  
gestellt werden. Die die Rekombinationskassette enthaltenden  
10 Primärtransformanten werden für die Transformation mit einer  
Expressionskassette, die die Expression des DSBI-Enzym  
gewährleistet, eingesetzt oder in geeigneter Weise bis zur  
Homozygotie geführt und dienen dann als Wirtsorganismus (bei-  
15 spielsweise Wirtspflanze) für die Transformation mit einer  
Expressionskassette, die die Expression des DSBI-Enzym ge-  
währleistet. Ausgehend von diesen Wirtspflanzen können bei-  
spielsweise in vitro Kulturen, wie z.B. Kallus- oder embryo-  
gene Kulturen angelegt, etabliert und zur Transformation ver-  
wendet werden. Die Transformation mit der Expressionskassette  
20 für das DSBI-Enzym kann jeweils stabil oder transient er-  
folgen.
- 2.) Es werden auf dem üblichen Weg sogenannte Masterorganismen  
hergestellt, die das entsprechende Gen für das DSBI-Enzym  
(bzw. eine Expressionskassette, die die Expression des DSBI-  
25 Enzym gewährleistet) tragen und exprimieren. Beispielsweise  
können entsprechende Masterpflanzen bevorzugt durch Agro-  
bakterien-vermittelte Transformation hergestellt werden. Die  
das DSBI-Enzym exprimierenden Primärtransformanten werden für  
die Transformation mit dem Rekombinationskonstrukt eingesetzt  
30 oder in geeigneter Weise bis zur Homozygotie geführt und  
dienen dann als Master- bzw. Wirtsorganismus (beispiels-  
weise Masterpflanze), in die die Rekombinationskonstrukte  
eingeführt werden. Ausgehend von diesen Masterpflanzen  
können beispielsweise in vitro Kulturen, wie z.B. Kallus-  
35 oder embryogene Kulturen angelegt, etabliert und zur Trans-  
formation verwendet werden.
- 3.) ~~Das Gen kodierend für das DSBI-Enzym (bzw. eine Expressions-~~  
40 ~~kassette, die die Expression des DSBI-Enzym gewährleistet)~~  
kann in einen Vektor, der bereits die Rekombinationskassette  
trägt, integriert werden und dadurch zeitgleich mit dem Ziel-  
gen in Pflanzenzellen eingeführt werden. Bevorzugt wird das  
Gen kodierend für das DSBI-Enzym zwischen die Homologie-  
sequenzen insertiert und somit nach Erfüllung seiner Funktion  
45 aus der chromosomalen DNA deletiert. Ganz besonders bevor-  
zugt erfolgt in diesem Fall die Expression des DSBI-Enzym  
induzierbar (beispielsweise unter Kontrolle eines der unten

- beschriebenen induzierbaren Promotoren), entwicklungsabhängig unter Verwendung eines entwicklungsabhängigen Promotors oder es werden DSBI-Enzyme eingesetzt, deren Aktivität induzierbar ist, um ein Schneiden des Rekombinationskonstruktes gleich nach der Transformation und vor der Insertion in das Genom zu vermeiden.
- 4.) Die Expressionskassette, die die Expression des DSBI-Enzym gewährleistet, kann mit Hilfe der Co-Transformation zeitgleich mit dem Rekombinationskonstrukt, aber auf einem separaten Vektor in die Zellen transformiert werden. Die Co-Transformation kann jeweils stabil oder transient erfolgen. Bevorzugt erfolgt in diesem Fall die Expression des DSBI-Enzyms induzierbar (beispielsweise unter Kontrolle eines der unten beschriebenen induzierbaren Promotoren), entwicklungsabhängig unter Verwendung eines entwicklungsabhängigen Promotors oder es werden DSBI-Enzyme eingesetzt, deren Aktivität induzierbar ist, um ein Schneiden des Rekombinationskonstruktes gleich nach der Transformation und vor der Insertion in das Genom zu vermeiden.
- 5.) Organismen, beispielsweise Pflanzen oder auch Tiere, die das DSBI-Enzym exprimieren, können auch als Kreuzungspartner dienen. In den Nachkommen der Kreuzung zwischen Organismen, die das DSBI-Enzym exprimieren, einerseits und Organismen, die das Rekombinationskonstrukt tragen, andererseits kommt es zu den erwünschten Doppelstrangbrüchen und der Rekombination zwischen den Homologiesequenzen, wobei ggf. die zwischen den Homologiesequenzen lokalisierten Sequenzen deletiert werden.
- 6.) Die Expression des DSBI-Enzyms ist auch in einem transienten Transformationsansatz, bei dem die Möglichkeiten 2 bis 4 genutzt werden können, denkbar.
- 7.) Das DSBI-Enzym kann auch direkt beispielsweise über Mikroinjektion, Partikel-Bombardierung (biolistische Verfahren), Polyethylenglykol-Transfektion oder Liposomen-vermittelte Transfektion in Zellen eingebracht werden, die das transgene Rekombinationskonstrukt beinhalten bzw. tragen. Diese Ausführungsform ist vorteilhaft, da hier keine DSBI-Enzym kodierenden Sequenzen im Genom verbleiben können. Ein entsprechendes Verfahren ist beispielsweise beschrieben bei Segal DJ et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:806-810.
- 8.) Das DSBI-Enzym kann auch durch Einführung der für das DSBI-Enzym kodierenden, in vitro erzeugten mRNA in Zellen (beispielsweise über Mikroinjektion, Partikel-Bombardierung (bio-

listische Verfahren) oder Liposomen-vermittelte Transfektion) erzeugt werden. Diese Ausführungsform ist vorteilhaft, da hier keine DSBI-Enzym kodierenden Sequenzen im Genom verbleiben können.

5

- 9.) Das DSBI-Enzym kann als Fusionsprotein mit dem VirE2 oder VirF Protein eines Agrobakterium in Pflanzenzellen eingeschleust werden. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise für die Cre-Rekombinase beschrieben (Vergunst AC et al. (2000) Science. 290: 979-982). Liegt die Expressionskassette für das Fusionsprotein außerhalb der "Border"-Sequenzen wird sie nicht in das pflanzliche Genom insertiert. Diese Ausführungsform ist vorteilhaft, da hier keine DSBI-Enzym kodierenden Sequenzen im Genom verbleiben können.

15

- Die Realisierung des erfindungsgemäßen Rekombinationssystems bzw. Verfahrens kann in intakten Organismen als auch in von diesen abgeleiteten Teilen, Zellen oder Vermehrungsgut erfolgen, besonders bevorzugt in intakten Pflanzen als auch in jedem Pflanzengewebe bzw. pflanzlichen in vitro Kulturen einschließlich Kallus. Auch eine in vitro Anwendung unter Einsatz von beispielsweise Weizenkeimextrakt oder Reticulozytenextrakt ist denkbar.

- Wie oben beschrieben kann das DSBI-Enzym unter Verwendung einer Expressionskassette, die die DNA kodierend für ein DSBI-Enzym enthält, und in eine eukaryotische Zelle oder Organismus eingebracht wird, erzeugt werden. Dabei enthält die Expressionskassette für das DSBI-Enzym bevorzugt eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein DSBI-Enzym gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 oder 10 oder ein funktionelles Äquivalent derselben, das in der Lage ist in doppelsträngige DNA unter Nutzung der im wesentlichen gleichen Erkennungssequenz DNA-Doppelstrangbrüche zu erzeugen. Im wesentlichen gleiche Erkennungssequenzen meint solche Erkennungssequenzen, die zwar Abweichungen von der für das jeweilige Enzym als optimal gefundenen Erkennungssequenz aufweisen, jedoch eine Spaltung durch dasselbe noch erlauben. Ganz besonders bevorzugt enthalten die Expressionskassetten für das DSBI-Enzym eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 oder 9.

- Expressionskassette meint - zum Beispiel in Bezug auf die Expressionskassette für das DSBI-Enzym - solche Konstruktionen bei denen die zu exprimierende DNA in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement steht, dass ihre Expression (d.h. Transkription und oder Translation) ermöglicht oder reguliert. Dabei kann die Expression zum Beispiel stabil oder transient, konstitutiv oder induzierbar erfolgen. Für die Einführung stehen dem Fachmann verschiedene unten aufgeführte

direkte (z.B. Transfektion, Partikelbeschuss, Mikroinjektion) oder indirekte Verfahren (z.B. Agrobakterieninfektion, Virusinfektion) zur Verfügung, die weiter unten aufgeführt werden.

- 5 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man allgemein eine Anordnung in der eine genetische Kontrollsequenz ihre Funktion in Bezug auf eine Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - ausüben kann. Funktion kann dabei beispielsweise die Kontrolle der Expression d.h. Transkription und/oder Translation der Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - bedeuten. Kontrolle umfasst dabei beispielsweise die Initiierung, Steigerung, Steuerung oder Suppression der Expression d.h. Transkription und ggf. Translation. Die Steuerung wiederum kann beispielsweise gewebe- und oder zeitspezifisch erfolgen. Sie kann auch induzierbar zum Beispiel durch bestimmte Chemikalien, Stress, Pathogene etc. sein.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promoters, der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - erfüllen kann.

- 25 Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - hinter eine als Promoter fungierende Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotersequenz und der Nukleinsäuresequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym - geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

- 40 Dem Fachmann sind verschiedene Wege bekannt, um zu einer solchen Expressionskassette zu gelangen. Die Herstellung erfolgt beispielsweise bevorzugt durch direkte Fusion einer als Promoter fungierenden Nukleinsäuresequenz mit einer zu exprimierenden Nukleotidsequenz - beispielsweise kodierend für ein DSBI-Enzym.
- 45 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und

J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

10 Eine Expressionskassette kann aber auch so konstruiert werden, das die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz (z.B. kodierend für ein DSBII-Enzym) beispielsweise mittels homologer Rekombination oder auch durch zufällige Insertion unter Kontrolle eines endogenen genetischen Kontrollelementes, beispielsweise eines Promotors, gebracht wird. Solche Konstruktionen sind ebenfalls  
15 als Expressionskassetten im Rahmen der Erfindung zu verstehen.

Dem Fachmann ist ferner bekannt, dass Nukleinsäuremoleküle auch unter Verwendung künstlicher Transkriptionsfaktoren vom Typ der Zinkfingerproteine zur Expression gebracht werden können (Beerli  
20 RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(4):1495-500). Diese Faktoren können an jeden beliebigen Sequenzbereich adaptiert werden und erlauben eine Expression unabhängig von bestimmten Promotorsequenzen.

25 Der Begriff der "genetischen Kontrollsequenzen" ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen gewährleisten zum Beispiel die Transkription und gegebenenfalls Trans-  
30 lation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminator-  
35 sequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz..

40 Genetische Kontrollsequenzen sind beispielsweise beschrieben bei "Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)" oder "Gruber and Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108" sowie den dort aufgewiesenen Zitaten.  
45

## 25

Beispiele für derartige Kontrollsequenzen sind Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Kontrollsequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Die Expressionskassette kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt, es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die vorstehend erwähnten Gene inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Kontrollsequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können auch allein vor die natürlichen Gene zur Steigerung der Aktivität gebracht werden.

Je nach nachstehend näher beschriebenen Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus, der durch Einbringen der Expressionskassetten oder Vektoren in einen genetisch veränderten oder transgenen Organismus überführt wird, eignen sich verschiedene Kontrollsequenzen.

Vorteilhafte Kontrollsequenzen für die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren sind beispielsweise in Promotoren wie *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *phoA*-, *tat*-, *lpp*-, *lac*-, *lacIq*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-,  $\lambda$ -PR- oder im  $\lambda$ -PL-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden.

Weitere vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MFA*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* oder in den Pflanzenpromotoren *CaMV/35S* (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294), *PRP1* (Martini N et al. (1993) Mol Gen Genet. 236(2-3):179-186), *SSU*, *OCS*, *LEB4*, *USP*, *STLS1*, *B33*, *NOS*; *FBPaseP* (WO 98/18940) oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten.

Für eine Expression in Vertebraten, bevorzugt in Säugern, sind Vektoren wie der *TK*-Promotor, der *RSV 3' LTR*-Promotor, der *CMV* Promotor, der *SV40 "early"* oder *late* Promotor, geeignet. Weitere Promotoren sind dem Fachmann geläufig. Induzierbare Promotoren geeignet für die Verwendung in Vertebraten, bevorzugt in Säugern, umfassen beispielsweise den *Tet*-Promotor/Repressor induzierbar oder reprimierbar durch Tetracyclin oder Derivate, den Dexamethason-induzierbaren *MMTV-LTR* Promotor, den *Drosophila* minimal

heat shock Promotor induzierbar durch Ecdysone oder das Analog Ponasterone A (im Rahmen beispielsweise des pVgRXR Expressionssystem; Invitrogen, Inc.).

- 5 Bevorzugt ist grundsätzlich jeder Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen steuern kann. Bevorzugt sind Promotoren, die eine konstitutive Expression in Pflanzen ermöglichen (Benfey et al. (1989) EMBO J. 8:2195-2202). Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen
- 10 Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Besonders bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. 1986, Plant Mol. Biol. 6,
- 15 221-228) oder den 19S CaMV Promotor (US 5,352,605 and WO 84/02913). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al. (1989) EMBO
- 20 J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028). Ein weiteres Beispiel eines geeigneten Promotors ist der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-No.: X03677). Weitere bevorzugte konstitutive Promotoren sind zum Beispiel der Promotor der
- 25 Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991).
- 30 Die Expressionskassetten können auch einen induzierbaren, bevorzugt einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Aoyama T und Chua NH (1997) Plant J 11:605-612; Caddick MX et al. (1998) Nat. Biotechnol 16:177-180; Rewiew: Gatz, Annu Rev Plant Physiol
- 35 Plant Mol Biol 1997, 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer (WO 95/19443), ein durch Benzol-
- 40 sulfonamid-induzierbarer (EP-A-0388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528), ein durch Salicylsäure induzierbarer (WO 95/19443) bzw. ein durch Ethanol-
- (Salter MG et al. (1998) Plant J. 16:127-132) oder Cyclohexanon-
- 45 induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können ebenfalls verwendet werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird vor allem die für das DSBI-Enzym kodierende Nukleinsäure unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert. Damit wird eine kontrollierte, steuerbare Expression und Deletion - beispielsweise in Pflanzen - erreicht und etwaige Probleme durch eine konstitutive Expression eines DSBI-Enzyms vermieden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al., Plant Mol Biol 1993, 22: 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder, der verwundungs-induzierte pinII-Promoter (EP375091).

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Pollen, Meristem, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen.

Ein entwicklungsabhängig regulierter Promotor ist unter anderem bei Baerson et al. beschrieben (Baerson SR, Lamppa GK (1993) Plant Mol Biol 22(2):255-67).

Besonders sind solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Stärke und/oder Ölen bzw. dessen Vorstufen stattfindet oder in denen die Produkte vorteilhafterweise akkumuliert werden. Der Biosyntheseort der Stärke sind die Chloroplasten der Blätter bzw. die Amyloplasten der Speicherorgane wie Samen, Früchte oder Knollen. In diesen Organen sind es v.a. die Zellen des Endosperms oder die Kotyledonen des Embryos, in denen die Synthese abläuft. Bevorzugte Promotoren sind insofern neben den oben genannten konstitutiven Promotoren, insbesondere samenspezifische Promotoren wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200, Bustos MM et al., Plant Cell. 1989;1(9):839-53), des 2S Albumingens (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262: 12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet. 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Molecular & General Genetics 225(3):459-67) des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K, et al. (1996) L. Planta 199: 515-519), des Saccharosebindepoteins (WO 00/26388) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Bäumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-239; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090-1093), der Ins Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO9845461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der



## 28

Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, 5 Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin- 10 Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).

Bevorzugt als genetische Kontrollelemente sind ferner pollen-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Promotor des B. campestris bgp1 gene (GenBank Acc.-No: X68210; Xu H et 15 al. (1993) Mol Gen Genet 239(1-2):58-65; WO 94/13809), des Oryza sativa ory s 1 Gens (GenBank Acc.-No.: AJ012760; Xu H et al. (1995) Gene 164 (2):255-259), des pollen-spezifischen Mais Gens ZM13 (Hamilton DA et al. (1998) Plant Mol Biol 38(4):663-669; US 5,086,169), des B.napus Gens Bp10 (GenBank Acc.-No.: X64257; 20 Albani D (1992) Plant J 2(3):331-342; US 6,013,859).

Ferner sind bevorzugt der Lcg1 Promotor für eine zellspezifische Expression in den männlichen Gameten (WO 99/05281; XU H et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96:2554-2558) und der 25 Promotor des AtDMC1 Gens (Klimyuk VI et al. (1997) Plant J. 11(1):1-14).

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie 30 beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor sowie frucht-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP-A 409625).

35

Weiterhin geeignete Promotoren sind solche, die eine blatt-spezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 98/18940), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat- 40 carboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8(9):2445-2451). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine Expression in Samen und pflanzlichen Embryonen steuern.

45 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungs-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungs-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794), blütenspezifische

## 29

Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder ein anderer Nodien-spezifischer Promotor wie in EP-A 249676 können vorteilhaft verwendet werden.

5

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

10

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische

15 Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH (1991) J Biol Chem 266(26):17131-17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Molecular & General Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

20

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen.

25 Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region

30 von Genen. Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al., Plant J. 35 1998, 15: 435-440.). Umgekehrt unterdrückt die 5'-untranslatierte Region des opaque-2 Gens die Expression. Eine Deletion der entsprechenden Region führt zu einer Erhöhung der Genaktivität (Lohmer S et al., Plant Cell 1993, 5:65-73).

40 Genetische Kontrollsequenzen können auch Ribosomenbindungssequenzen zur Initiation der Translation umfassen. Dies ist vor allem dann bevorzugt, wenn von der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz entsprechende Sequenzen nicht bereitgestellt werden oder diese mit dem Expressionssystem nicht kompatibel sind.

45

Die Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu  
5 exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen insertiert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

10

Genetische Kontrollsequenzen meint ferner Sequenzen, die für Fusionsproteine bestehend aus einer Signalpeptidsequenz kodieren.

Als genetische Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungs-  
15 signale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente  
20 davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalin-Synthase)-Terminator.

Wie oben erwähnt können die erfindungsgemäßen Rekombinations-  
25 Konstrukte weitere Nukleinsäuresequenzen umfassen. Solche Nukleinsäuresequenzen können bevorzugt Expressionskassetten darstellen. Beispielhaft aber nicht einschränkend für die in den Expressionskonstrukten zu exprimierenden DNA-Sequenzen seien zu nennen:

30

i) Positive Selektionsmarker:

Selektionsmarker sind in der Regel erforderlich, um erfolgreich homolog rekombinierte oder transformierte Zellen zu  
35 selektionieren. Der mit dem Expressionskonstrukt eingebrachte selektionierbare Marker verleiht den erfolgreich rekombinierten oder transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid wie Phosphinothricin, Glyphosat oder Bromoxynil), einen Metabolismusinhibitor  
40 wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum, wie zum Beispiel Tetracycline, Ampicillin, Kanamycin, G 418, Neomycin Bleomycin oder Hygromycin, verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick  
45 et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen

Herbizide verleihen. Beispielhaft als Selektionsmarker seien genannt:

- 5        - DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren, welche die freie Aminogruppe des Glutaminsynthaseinhibitors Phosphinothricin (PPT) acetyliert und damit eine Detoxifizierung des PPT erreicht (de Block et al. 1987, EMBO J. 6, 2513-2518) (auch Bialophos® resistenzgen (bar) genannt)
- 10       - 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen,
- 15       - das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase),
- das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon® inaktiviert),
- 20       - Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen
- bxn Gene, die für Bromoxynil® degradierende Nitrilaseenzyme kodieren
- 25       - das Kanamycin- bzw. G418- Resistenzgen (NPTII). Das NPTII Gen codiert für eine Neomycinphosphotransferase, die durch eine Phosphorylierungsreaktion die inhibierende Wirkung von Kanamycin, Neomycin, G418 und Paromomycin reduziert.
- 30       - das DOGR<sup>1</sup>-Gen. Das Gen DOGR<sup>1</sup> wurde aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (EP 0 807 836). Es codiert für eine 2-Desoxyglukose-6-phosphat Phosphatase, die Resistenz gegenüber 2-DOG verleiht (Randez-Gil et al. 1995, Yeast 11, 1233-1240).
- 35       -
- 40       ii) Negative Selektionsmarker ermöglichen beispielsweise die Selektion von Organismen mit erfolgreich deletierten Sequenzen, die das Markergen umfassen (Koprek T et al. (1999) The Plant Journal 19(6):719-726). TK thymidine kinase (TK) and diphtheria toxin A fragment (DT-A), codA Gen kodierend für eine Cytosindeaminase (Gleve AP et al. (1999) Plant Mol Biol. 40(2):223-35; Pereat RI et al. (1993) Plant Mol. Biol. 23(4): 793-799; Stougaard J; (1993) Plant J 3:755-761), das Cytochrom P450 Gen (Koprek et al. (1999)
- 45       -

Plant J. 16:719-726), Gene kodierend für eine Haloalkan Dehalogenase (Naested H (1999) Plant J. 18:571-576), das iaaH Gen (Sundaresan V et al. (1995) Genes & Development 9:1797-1810) oder das tms2 Gen (Fedoroff NV & Smith DL 1993, Plant J 3: 273- 289).

- iii) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz, des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Gene kodierend für Reporter-Proteine (siehe auch Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie
- "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997; Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228).
  - Chloramphenicoltransferase,
  - Luziferase (Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414; Ow et al. (1986) Science, 234:856-859); erlaubt Biolumineszenzdetektion.
  - $\beta$ -Galactosidase, kodiert für ein Enzym für das verschiedenen chromogene Substrate zur Verfügung stehen.
  - $\beta$ -Glucuronidase (GUS) (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907) oder das uidA Gen, das ein Enzym für verschiedene chromogene Substrate kodiert.
  - R-Locus Genprodukt:Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promoter-aktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfsstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht (Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988).

## 33

- $\beta$ -Lactamase (Sutcliffe (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75:3737-3741), Enzym für verschiedene chromogene Substrate (z.B. PADAC, eine chromogenes Cephalosporin).
- 5 - xylE Genprodukt (Zukowsky et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:1101-1105), Catecholdioxygenase, die chromogene Catechole umsetzen kann.
- Alpha-Amylase (Ikuta et al. (1990) Bio/technol. 8:241-242).
- 10 - Tyrosinase (Katz et al. (1983) J Gen Microbiol 129:2703-2714), Enzym, das Tyrosin zu DOPA und Dopäquinon oxidiert, die infolge das leicht nachweisbare Melanin bilden.
- 15 - Aequorin ( Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), kann in der Calcium-sensitiven Biolumineszenzdetektion verwendet werden.

20 Das erfindungsgemäße Rekombinationskonstrukt und die gegebenenfalls von ihnen abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff der weitere Funktionselemente ist breit zu verstehen. Bevorzugt sind all solche Elemente gemeint, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung, Funktion, Nutzen oder Wert des erfindungsgemäßen Rekombinationssystems, Rekombinationskonstruktes oder diese beinhaltende Zellen oder Organismen haben. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien für die weiteren Funktionselemente zu nennen:

- 30 iv) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E. coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 35 1989).
- v) Multiple Klonierungsregionen (MCS) erlauben und erleichtern 40 die Insertion eines oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen.
- vi) Sequenzen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen.
- 45 vii) Elemente zum Beispiel "Bordersequenzen", die einen Agrobakterien-vermittelte Transfer in Pflanzenzellen für die Übertragung und Integration ins Pflanzengenom ermöglichen,

wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

All die oben erwähnten Expressionskassetten oder weiteren  
5 Funktionselemente können, wie erwähnt, zwischen den Homologie-  
sequenzen A und B lokalisiert sein. Sie können aber auch außer-  
halb von diesen liegen. Dies ist vor allem bei "Bordersequenzen"  
vorteilhaft.

- 10 Die Einführung einer erfindungsgemäßen Rekombinationskassette  
oder eines Expressionskonstruktes für ein DSBI-Enzym in Zellen  
kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden,  
in die diese Konstrukte bzw. Kassetten insertiert werden.  
Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren,  
15 Retroviren oder auch Agrobacterien sein.

Als Vektoren zur Expression in E.coli sind bevorzugt pQE70, pQE60  
und pQE-9 (QIAGEN, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript  
Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning  
20 Systems, Inc.); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5  
(Pharmacia Biotech, Inc.).

Bevorzugte Vektoren zur eukaryotischen Expression umfassen  
pWLNE0, pSV2CAT, pOG44, pXT1 und pSG (Stratagene Inc.); pSVK3,  
25 pBPV, pMSG und pSVL (Pharmacia Biotech, Inc.). Als induzierbare  
Vektoren seien pTet-Thia, Potter-Splice, pcDNA4/TO, pcDNA4/TO /  
LacZ, pcDNA6/TR, pcDNA4/TO/Myc-His /LacZ, pcDNA4/TO/Myc-His A,  
pcDNA4/TO/Myc-His B, pcDNA4/TO/Myc-His C, pVgRXR (Invitrogen,  
Inc.) oder die pMAM-Serie (Clontech, Inc.; GenBank Accession No.:  
30 U02443) zu nennen. Diese stellen bereits das induzierbare regu-  
latorische Kontrollelement beispielsweise für eine chemisch,  
induzierbare Expression eines DSBI-Enzyms zur Verfügung. In diese  
Vektoren kann die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein DSBI-  
Enzym direkt insertiert werden.

35 Vektoren für die Expression in Hefe umfassen beispielhaft pYES2,  
pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9,  
~~pPIC3.5, PHIL-D2, PHIL-S1, pPIC3SK, pPIC9K, und PA0815~~ (Invitro-  
gen, Inc.).

40 In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der  
Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevor-  
zugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der  
Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

## 35

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene, eukaryotische Organismen, die das erfindungsgemäße Rekombinationssystem enthalten sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln, Samen, Früchte, Pollen usw. - abgeleitet von solchen Organismen.

Eukaryotischer Organismus, Ausgangs- oder Wirtsorganismus meint niedere und höhere, einzellige und mehrzellige eukaryotische Organismen. Umfasst sind auch eukaryotische Mikroorganismen wie beispielsweise Hefen, Algen oder Pilze.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*, besonders bevorzugt sind *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* (ATCC Accession No. 201178).

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria* oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze. Besonders bevorzugt ist der filamentöse *Hemiascomycet Ashbya gossypii*.

Erfindungsgemäß bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind weiterhin tierische Organismen und von diesen abgeleitete Zellen oder Gewebe. Tierische Organismen umfasst bevorzugt Vertebraten und Invertebraten. Besonders bevorzugte Vertebraten sind Säuger wie in Hund, Katze, Schaf, Ziege, Huhn, Maus, Ratte, Rind oder Pferd. Bevorzugte tierische Zellen umfassen CHO, COS, HEK293 Zellen. Bevorzugte Invertebraten umfassen Insektenzellen wie *Drosophila* S2 und *Spodoptera* Sf9 oder Sf21 Zellen.

Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.



## 36

Das erfindungsgemäße Rekombinationssystem ist bevorzugt für folgende Pflanzenfamilien verwendbar: Amaranthaceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae-Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Tetragoniaceae.

Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugte Wirtsorganismen für die Herstellung transgener Pflanzen. Die Verwendung des erfindungsgemäßen Rekombinationssystems bzw. Verfahrens ist ferner vorteilhaft bei allen Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäumen, Blumen, Schnittblumen, Sträuchern oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Kieferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetalen; Algen wie Chlorophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae, Xanthophyceae, Bacillariophyceae (Diatomeen) und Euglenophyceae.

Pflanzen im Rahmen der Erfindung umfassen beispielhaft und nicht einschränkend die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Beispielhaft aber nicht einschränkend für Blütenpflanzen seien zu nennen die Familien der Leguminosae wie Erbse, Alfalfa und Soja; Gramineae wie Reis, Mais, Weizen; Solanaceae wie Tabak und andere mehr; die Familie der Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karrotte)) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Selderie)) und andere mehr; die Familie der Solanaceae, besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate) und die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine) und andere mehr; und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Pfeffer) und andere mehr; die Familie der Leguminosae, besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) und andere mehr; und die Familie der Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli); und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art

thaliana und andere mehr; die Familie der Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr.

- 5 Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen sind insbesondere ausgewählt unter monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis oder Hafer sowie dem Zuckerrohr. Ferner sind die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen insbesondere ausgewählt unter
- 10 dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

Brassicaceae wie Raps (B.napus), Kresse, Arabidopsis, Kohlarten oder Canola, Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss

15

Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika, Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,

Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,

20

sowie Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinspecies.

- 25 Besonders bevorzugt sind Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum und Raps sowie alle Gattungen und Arten, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, wie die beschriebenen Getreidearten, oder sich zur Herstellung von Ölen eignen, wie Ölsaaten (wie zum Beispiel Raps), Nussarten, Soja, Sonnenblume,
- 30 Kürbis und Erdnuss.

Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive befähigte Organismen, wie zum Beispiel Algen oder Cyanobakterien, sowie Moose.

35

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung Haematococcus, Phaedactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella.

- 40 Die Herstellung eines transformierten Organismus oder einer transformierten Zelle erfordert, dass die entsprechende DNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Keown et al. 1990
- 45 Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle

chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Als bevorzugte allgemeine Methoden seien zu nennen Calciumphosphat vermittelte Transfektion, DEAE-Dextran vermittelte Transfektion, kationische Lipid-vermittelte Transfektion, Elektroporation, Transduktion, Infektion. Derartige Verfahren sind dem Fachmann geläufig und beispielsweise beschrieben bei Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986).

- Bei Pflanzen werden dem Fachmann geläufige Methoden der Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, biologische Verfahren wie die Genkanone ("particle bombardment" Methode), die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Sonikation und die Mikroinjektion sowie die Transformation intakter Zellen oder Gewebe durch Mikro- oder Makroinjektion in Gewebe oder Embryonen, Gewebeelektroporation, Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung oder die Vakuuminfiltration von Samen. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es nützlich, das sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Jedes Pflanzengewebe kann als Zielmaterial dienen. Ebenso kann die Expression in Kallus, embryogenem Gewebe bzw. somatischen Embryonen erfolgen.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Diese Stämme enthalten ein Plasmid (Ti bzw. Ri Plasmid). Ein Teil dieses Plasmids, genannt T-DNA (transferred DNA), wird auf die Pflanze nach *Agrobacterium*-Infektion übertragen und in das Genom der Pflanzenzelle integriert.

Das Rekombinationskonstrukt oder die Expressionskassette für das DSBI-Enzym wird bevorzugt in spezielle Plasmide integriert, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wenn zum Beispiel ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden. Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium* transformiert werden (Holsters et al., Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobakteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende *Agrobacterium* sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes *Agrobacterium* kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden.

Die Anwendung von *Agrobacterium tumefaciens* für die Transformation von Pflanzen unter Verwendung von Gewebekulturrexplantaten wurde beschrieben von Horsch et al. (Horsch RB (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83(8):2571-2575), Fraley et al. (Fraley et al. 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4803-4807) und Bevans et al. (Bevans et al. 1983, Nature 304, 184-187). Viele Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* sind in der Lage, genetisches Material - beispielsweise die erfindungsgemäßen Rekombinationskonstrukte - zu übertragen, wie z.B. die Stämme EHA101[pEHA101], EHA105[pEHA105], LBA4404[pAL4404], C58C1[pMP90] und C58C1[pGV2260]. Der Stamm EHA101[pEHA101] wurde von Hood et al. (Hood EE et al. (1996) J Bacteriol 168(3):1291-1301), der Stamm EHA105[pEHA105] von Hood et al. (Hood et al. 1993, Transgenic Research 2, 208-218), der Stamm LBA4404[pAL4404] von Hoekema et al. (Hoekema et al. 1983, Nature 303, 179-181), der Stamm C58C1[pMP90] von Koncz and Schell (Koncz and Schell 1986, Mol. Gen. Genet. 204, 383-396) und der Stamm C58C1[pGV2260] von Deblaere et al. (Deblaere et al. 1985, Nucl. Acids Res. 13, 4777-4788) beschrieben.

Der für die Transformation eingesetzte Agrobakterienstamm enthält zusätzlich zu seinem entwaффneten Ti-Plasmid ein binäres Plasmid mit der zu übertragenden T-DNA, die in der Regel ein Gen für die Selektion der transformierten Zellen und das zu übertragende Gen

enthält. Beide Gene müssen mit transkriptionalen und translationalen Initiations- und Terminationssignalen ausgestattet sein. Das Binärplasmid kann beispielsweise durch Elektroporation oder andere Transformationsmethoden in den Agrobakterienstamm  
5 übertragen werden (Mozo & Hooykaas 1991, Plant Mol. Biol. 16, 917-918). Die Cokultur der pflanzlichen Explantate mit dem Agrobakterienstamm findet in der Regel für zwei bis drei Tage statt.

Verschiedene Vektoren waren bzw. sind verwendbar. Grundsätzlich  
10 kann zwischen solchen Vektoren unterschieden werden, die für die Agrobakterien-vermittelte Transformation bzw. Agroinfektion eingesetzt werden können, d.h. die Rekombinationskonstrukte bzw. die Expressionskassette für die Expression des DSBI-Enzyms, innerhalb einer T-DNA enthalten, was sogar die stabile Integration der  
15 T-DNA ins Pflanzengenom zulässt. Außerdem können Bordersequenz-freie Vektoren eingesetzt werden, die beispielsweise durch Partikelbeschuss in die Pflanzenzellen transformiert werden können und dort sowohl zu einer transienten als auch zu einer stabilen Expression führen können.

20

Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasterdam, Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci.,  
25 4:1-46 and An et al., EMBO J. 4 (1985), 277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Für den Transfer der DNA auf die pflanzliche Zelle werden pflanzliche Explantate mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert. Ausgehend von infiziertem Pflanzenmaterial (z.B. Blatt-, Wurzel- oder Stengelteile, aber auch Protoplasten oder Suspensionen von Pflanzenzellen) können ganze Pflanzen unter Verwendung eines geeigneten Mediums, dass zum  
35 Beispiel Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierten Zellen enthalten kann, regeneriert werden. Die erhaltenen Pflanzen können dann auf die Präsenz der eingeführten DNA, hier des erfindungsgemäßen Rekombinationskonstruktes oder der Expressionskassette für das DSBI-Enzym, durchmustert werden.  
40 Sobald die DNA in das Wirtsgenom integriert ist, ist der entsprechende Genotyp in der Regel stabil und die entsprechende Insertion wird auch in den Nachfolgegenerationen wiedergefunden. In der Regel enthält die integrierte Expressionskassette einen Selektionsmarker, der der transformierten Pflanze eine Resistenz  
45 gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herizid) oder ein Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc. verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von

## 41

transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al., " Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, 5 dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., " Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und 10 R. Wu, Academic Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., 15 Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet, wohingegen die direkten Transformationstechniken sich für jeden Zelltyp eignen.

20

Transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann 25 beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide zu verleihen vermag. Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Verschiedene positive und negative 30 Selektionsmarker sind weiter oben beschrieben. Beispiel sind das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin verleiht (Rathore KS et al., Plant Mol Biol. 1993 Mar;21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt 35 Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht.

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft 40 von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

45

## 42

Erfindungsgemäß sind ferner von den oben beschriebenen transgenen Organismen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte).

5

Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Aufbereitung als Nahrungsmittel oder Futtermittel verwendet werden. Hier ist eine Deletion von beispielsweise Antibiotika- und/oder Herbizidresistenzen, wie sie oft bei der Erzeugung der transgenen Pflanzen eingeführt werden, aus Gründen der Kundenakzeptanz aber auch der Produktsicherheit sinnvoll.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Samen oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien. Auch hier ist eine Deletion von beispielsweise Antibiotika- und/oder Herbizidresistenzen aus Gründen der Kundenakzeptanz aber auch der Produktsicherheit vorteilhaft.

25 Feinchemikalien meint Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakzinen ist beschrieben (Hood EE, Jilka JM. (1999) Curr Opin Biotechnol. 10(4):382-386; Ma JK und Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol. 236:275-92).

Ferner bietet das erfindungsgemäße Rekombinationssystem bzw. Verfahren ~~verschiedene vorteilhafte Anwendungsmöglichkeiten,~~ die sich mit den im Stand der Technik beschriebenen Deletionsverfahren nicht erreichen lassen. Verschiedene Anwendungsbeispiele sind nachfolgend beispielhaft, aber nicht einschränkend beschrieben:

## 43

1. Einfache Deletion einer Nukleinsäuresequenz aus der chromosomalen DNA eines Organismus:

Unter Verwendung beliebiger Homologiesequenzen A und B können zwischen diesen lokalisierten Nukleinsäuresequenzen deletiert werden. Die aus den Homologiesequenzen A und B rekombinierte Sequenz verbleibt im Genom. Das Verfahren eignet sich beispielsweise, um Selektionsmarker nach der Herstellung eines transgenen Organismus - beispielsweise einer transgenen Pflanze - wieder aus der chromosomalen DNA zu entfernen. Das Verfahren ist schematisch in Fig. 2 und 3 dargestellt, wobei in Fig. 2 die Variante mit einer Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und in Fig. 3 die Variante mit zwei Erkennungssequenzen zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wiedergegeben ist.

2. Vollständige Deletion transgen eingeführter heterologer Nukleinsäuresequenzen aus der chromosomalen DNA eines Organismus:

Unter Verwendung von Homologiesequenzen A und B, die zu bestimmten Sequenzen des Organismus homolog sind, kann das Expressionskonstrukt durch homologe Rekombination in den Organismus eingeführt werden. Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Rekombinationssystems bzw. Verfahrens würden die zwischen den Homologiesequenzen lokalisierten Nukleinsäuresequenzen deletiert werden. Die induzierte homologe Rekombination zwischen Homologiesequenzen A und B stellt die ursprüngliche Sequenz wieder her. Das Konstrukt wird rückstandslos aus der chromosomalen DNA entfernt. Das Verfahren eignet sich beispielsweise, um Selektionsmarker nach der Herstellung einer transgenen Pflanze wieder aus der chromosomalen DNA zu entfernen. Ferner ist das erfindungsgemäße System bzw. Verfahren dazu geeignet bestimmte Proteine zum Erreichen eines vorteilhaften Effektes vorübergehend zu exprimieren und - unter Verwendung einer induzierten DSBI-Enzym Expression oder Aktivität - wieder abzuschalten, indem das entsprechende Gen irreversibel wieder aus dem Genom entfernt wird. Das Verfahren ist schematisch in Fig. 4 dargestellt, wobei hier die Variante mit zwei Erkennungssequenzen zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wiedergegeben ist. Das System lässt sich auch mit einer Erkennungssequenz realisieren, bei größeren Insertionen zwischen den Homologiesequenzen A und B sind jedoch zwei Schnittstellen vorteilhaft, da so die Effizienz der Deletion und homologen Rekombination weiter gesteigert werden kann. (Innerhalb des



zu deletierenden Sequenzbereiches können weitere Erkennungssequenzen lokalisiert sein.)

3. Induzierte Genaktivierung durch gezielte Deletion von  
5 Nukleinsäuresequenzen:

Unter Verwendung von Homologiesequenzen A und B, deren homologe Rekombination beispielsweise ein vollständiges offenes Leseraster eines Proteins bzw. einen funktionsfähigen  
10 Promotors wiederherstellt, kann - abhängig von der Gegenwart des DSBI-Enzyms - die induzierbare Expression von Zielproteinen realisiert werden. Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Rekombinationssystems bzw. Verfahrens würden die zwischen den Homologiesequenzen lokalisierten Nukleinsäuresequenzen deletiert werden. Das Verfahren ist schematisch  
15 in Fig. 5 und 6 dargestellt, wobei in Fig. 6 eine spezielle Ausführungsform von dem in Fig. 5 dargestellten allgemeinen Verfahren wiedergegeben wird, bei dem das Rekombinationskonstrukt zuvor durch homologe Rekombination in ein endogenes  
20 Gen insertiert wird und dieses dadurch - abhängig von der Gegenwart des DSBI-Enzyms - induzierbar aktiviert werden kann. Fig. 7a verdeutlicht das System der Genaktivierung an einem konkreten Ausführungsbeispiel, bei dem unter Verwendung des erfindungsgemäßen Systems bzw. Verfahrens das Gen der  
25  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) rekonstituiert wird, was eine Farbreaktion ermöglicht (s. Beschreibung zu Fig. 7a und Beispiele).

4. Leicht selektionierbares System zur Deletion einer Nukleinsäuresequenz aus der chromosomalen DNA eines Organismus:  
30

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Rekombinationskonstrukt einem positiven und einem negativen Selektionsmarker (und ggf. weitere zu deletierende Nukleinsäuresequenzen) derart, dass bei Induktion der Doppelstrangbrüche beide Marker deletiert werden. Ein entsprechendes System ist in Fig. 8 und 9 (A) dargestellt. Weiterhin kann  
35 auch die ~~Expressionskassette für das DSBI-Enzym zwischen den~~ Homologiesequenzen enthalten sein (Fig. 10 (B)), wobei die Expression bevorzugt unter der Kontrolle eines Induzierbaren Promotors (Pi) (z.B.: Aoyama T und Chua NH (1997) Plant J 11:605-612; Caddick MX et al. (1998) Nat. Biotechnol 16:177-180) realisiert wird. Wie bereits beschrieben können weitere Nukleinsäuresequenzen enthalten sein (Fig. 9 (C)).  
40

## 45

Die Expression des DSBI-Enzyms führt in allen Fällen dazu, dass die DNA Sequenzen, die zwischen den beiden Erkennungssequenzen liegen, eliminiert werden und die homologen Sequenzen rekombinieren. Da die Zellen gleichzeitig einen negativen Selektionsmarker verlieren, können die Zellen mit einer erfolgreich realisierten Deletion durch Selektion identifiziert werden (Gleave AP et al. (1999) Plant Mol Biol. 40:223-235).

Aus den so erhaltenen Zellen können beispielsweise im Falle von Pflanzenzellen die entsprechenden vollständigen Pflanzen regeneriert und vermehrt werden, die nun keinerlei Markergene mehr enthalten.

#### 5. Genetische Manipulation des Wirtsgenoms:

Das erfindungsgemäße Rekombinationssystem bzw. Verfahren kann zu in situ Modifikationen des Wirtsgenoms verwendet werden. So kann beispielsweise eine Homologiesequenzen bereits endogen im Genom vorliegen. Nach Insertion der zweiten Homologiesequenz verknüpft mit einer DSBI-Enzym-Erkennungssequenz werden etwaige zwischen den Homologiesequenzen A und B gelegene regulatorische oder codierende Sequenzen aus dem Genom entfernt.

Gleichzeitig ist es denkbar, dass das Rekombinationskonstrukt regulatorische oder codierende Sequenzen umfaßt, die nach der Deletion wieder aus dem Organismus entfernt werden. So kann ein endogenes Gen beispielsweise vorübergehend gezielt reguliert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz des Rekombinationssystems gesteigert durch Kombination mit Systemen, die die homologe Rekombination fördern. Solche Systeme sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J. 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruchs und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Di-hydro-[2H]benzopyrano[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150),

5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384, WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und WO 01/23390 beschriebenen Verbindungen.

- 5 Daneben konnten verschiedene homologe Rekombinationsreaktionen in Pflanzen durch die Expression des RecA Gens von E. coli in ihrer Frequenz erhöht werden (Reiss B et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(7):3094-3098). Auch wird bei Anwesenheit des Proteins das
- 10 Verhältnis von homologer zu illegitimer DSB Reparatur zugunsten der homologen Reparatur verschoben (Reiss B et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(7):3358-3363). Verwiesen sei auch auf die in WO 97/08331 beschriebenen Verfahren zur Steigerung der homologen Rekombination in Pflanzen. Eine weitere Steigerung der
- 15 Effizienz des Rekombinationssystem könnte durch die gleichzeitige Expression des RecA Gens oder anderer Gene die die homologe Rekombinationseffizienz erhöhen (Shalev G et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(13):7398-402) erreicht werden. Die oben angegebenen Systeme zur Förderung der homologen Rekombination können
- 20 auch dort vorteilhaft eingesetzt werden, wo das Rekombinationskonstrukt durch homologe Rekombination gezielt in das Genom eines eukaryotischen Organismus eingeführt werden soll.

#### Sequenzen

- 25
1. SEQ ID NO:1  
Nukleinsäuresequenz für die I-SceI Homing-Endonuklease.
2. SEQ ID NO:2
- 30 Proteinsequenz für die I-SceI Homing-Endonuklease.
3. SEQ ID NO:3  
Nukleinsäuresequenz für Fusionsprotein aus I-ChuI Homing-Endonuklease und N-terminaler Kernlokalisationssequenz.
- 35
4. SEQ ID NO:4  
Proteinsequenz für Fusionsprotein aus I-ChuI Homing-Endonuklease und N-terminaler Kernlokalisationssequenz.
- 40 5. SEQ ID NO:5  
Nukleinsäuresequenz für Fusionsprotein aus I-CreI Homing-Endonuklease und N-terminaler Kernlokalisationssequenz.
6. SEQ ID NO:6
- 45 Proteinsequenz für Fusionsprotein aus I-CreI Homing-Endonuklease und N-terminaler Kernlokalisationssequenz.

7. SEQ ID NO:7  
Nukleinsäuresequenz für Fusionsprotein aus I-CpaI Homing-  
Endonuklease und N-terminaler Kernlokalisationssequenz.
- 5 8. SEQ ID NO:8  
Proteinsequenz für Fusionsprotein aus I-CpaI Homing-Endo-  
nuklease und N-terminaler Kernlokalisationssequenz.
9. SEQ ID NO:9  
10 Nukleinsäuresequenz für Fusionsprotein aus I-CpaII Homing-  
Endonuklease und N-terminaler Kernlokalisationssequenz.
10. SEQ ID NO:10  
15 Proteinsequenz für Fusionsprotein aus I-CpaII Homing-Endo-  
nuklease und N-terminaler Kernlokalisationssequenz.
11. SEQ ID NO: 11: Oligonukleotid-Primer OPN1  
5'-CGG CTC GAG CTA CGG GGA CGA TTT CTT TTT TTC AC-3'
- 20 12. SEQ ID NO: 12: Oligonukleotid-Primer OPN2  
5'-CGG CTC GAG TAC CTA GAA TAC AAA GAA GAG GAA GAA ACC  
TCT ACA GAA GAA GCC ATG GGT CCA AAG AAA AAG AGA AAG GTT ATC  
AT GAA TAC AAA ATA TAA TAA AGA GTT CTT ACT C-3'
- 25 13. SEQ ID NO: 13: Oligonukleotid-Primer OPN3  
5'-CGG CTC GAG TAC CTA GAA TAC AAA GAA GAG GAA GAA ACC  
TCT ACA GAA GAA GCC ATG GGT CCA AAG AAA AAG AGA AAG GTT ATC  
ATG GAC ATT AAT CCT CAA TGG ATT ACA GG- 3'
- 30 14. SEQ ID NO: 14: Oligonukleotid-Primer OPN4  
5'-CGG CTC GAG TTA CTC GCC AGT TTC TTC AAA ACG-3'
15. SEQ ID NO: 15: Oligonukleotid-Primer OPN5  
35 5'-CGG CTC GAG TAC CTA GAA TAC AAA GAA GAG GAA GAA ACC  
TCT ACA GAA GAA GCC ATG GGT CCA AAG AAA AAG AGA AAG GTT ATC  
ATG ACC GAT TCT AAA TCT AGA AAC AAC-3'
16. SEQ ID NO: 16: Oligonukleotid-Primer OPN6  
5'-CGG CTC GAG CTA AAG GTG GCC TTT ATT GCC ATC AG-3'
- 40 17. SEQ ID NO: 17: Oligonukleotid-Primer OPN7  
5'-CGG CTC GAG TAC CTA GAA TAC AAA GAA GAG GAA GAA ACC  
TCT ACA GAA GAA GCC ATG GGT CCA AAG AAA AAG AGA AAG GTT ATC  
ATG TCA TTA ACA CAA CAA CAA AAA GAC-3'
- 45

## 48

18. SEQ ID NO: 18: Oligonukleotid-Primer OPN8  
5'-CGG CTC GAG CTA AAG GTG GCC TTT ATT GCC ATC AG-3'
19. SEQ ID NO: 19: Oligonukleotid-Primer OPN9  
5'-CGG CTC TAG AGC GGC CGC CTA GGG ATA ACA GGG TAA TAG AAT  
CCC ACA AAA ATC TGA GCT TAA CAG 3'
20. SEQ ID NO: 20: Oligonukleotid-Primer OPN10  
5'-CGG CTC TAG ACT ATT ACC CTG TTA TCC CTA GGC CCG ATC TAG  
TAA CAT AGA TGA CAC CGC GCG CG 3'
21. SEQ ID NO: 21: Oligonukleotid-Primer OPN11  
5'- CGG AAG CTT CGT CAC CAA TCC CAA TTC GAT CTA C - 3'
22. SEQ ID NO: 22: Oligonukleotid-Primer OPN12  
5'- CGG AAG CTT CCA CTT GCA AAG TCC CGC TAG TGC C - 3'
23. SEQ ID NO: 23: Oligonukleotid-Primer OPN13  
5'- CGG AAG CTT CGT CAC CAA TCC CAA TTC GAT CTA C - 3'
24. SEQ ID NO: 24: Oligonukleotid-Primer OPN14  
5'- CGG AAG CTT CCA CTT GCA AAG TCC CGC TAG TGC C - 3'
25. SEQ ID NO: 25: Oligonukleotid-Primer OPN15  
5'- CTA GTA CAA AAC GTC GTG AGA CAT TTT AAT CTG AAG GTT TGG  
CAC CTC GAT GTC GGC TCA TC-3'
26. SEQ ID NO: 26: Oligonukleotid-Primer OPN16  
5'-CTA GGA TGA GCC GTC ATC GAG GTG CCA AAC CTT CAG ATT AAA  
ATG TCT CAC GAC GTT TTG TA-3'
27. SEQ ID NO: 27: Oligonukleotid-Primer OPN17  
5'-CTA GTC CGA AAA CGC CGT GAG ACA TAT TGG TTA CGA TCC TAA  
GGT AGC GAA ATT CAC CCG GTA ACT CTG TGC CAG-3'
28. SEQ ID NO: 28: Oligonukleotid-Primer OPN18  
5'-CTA GCT GGC ACA GAG TTA CCG GGT GAA TTT CGC TAC CTT AGG  
ATC GTA ACC AAT ATG TCT CAC GGC GTT TTC GGA-3'
29. SEQ ID NO: 29: Kernlokalisationssequenz NLS1  
N-Pro-lys-Thr-Lys-Arg-Lys-Val-C
30. SEQ ID NO: 30: Kernlokalisationssequenz NLS2  
N-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-C (SEQ ID NO: 30)

## Abbildungen

Für die Abbildungen gelten allgemein nachfolgende Abkürzungen:

- 5 H1: Homologiesequenz A  
H2: Homologiesequenz B  
H1/2: Sequenz als Ergebnis der homologen Rekombination aus H1 und H2  
S1: erste Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen  
10 S2: zweite Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen  
E: DSBI-Enzym  
P: Promotor oder anderes genetisches Kontrollelement  
15 N: weitere Nukleinsäuresequenz  
NS: Negativer Selektionsmarker  
PS: Positiver Selektionsmarker  
T1: Vorderer Teil beispielsweise eines Gens oder offenen Leserasters  
20 T2: Hinterer Teil beispielsweise eines Gens oder offenen Leserasters  
STOP: Unterbrechung eines Gens oder offenen Leserasters durch beispielsweise Stop-Kodons oder Verschiebung des Leserasters.

- 25 Fig. 1: Darstellung des Prinzips der Erfindung  
Sequenzen im Genom können effizient eliminiert werden, wenn sie von den Homologiesequenzen H1 und H2 flankiert sind und sich zwischen den Homologiesequenzen eine  
30 Schnittstelle (S1) für ein DSBI-Enzym befindet. Durch Einwirkung des DSBI-Enzyms (E) auf diese Rekombinationskassette (H1-S1-H2) kommt es nach Bildung von Doppelstrangbrüchen an der Schnittstelle S1 und zur Eliminierung der zwischen H1 und H2 gelegenen Sequenzen.

- 35 Fig. 2: Bevorzugte Ausführungsform  
Sequenzen - hier beispielsweise eine Expressionskassette bestehend aus einem Promotor (P) und einer zu exprimierenden weiteren Nukleinsäuresequenz (N) (beispielsweise einem Selektionsmarker) - können effizient aus der  
40 chromosomalen DNA eliminiert werden, wenn sie von den Homologiesequenzen H1 und H2 flankiert sind und sich zwischen den Homologiesequenzen eine Schnittstelle (S1) für ein DSBI-Enzym befindet. Durch Einwirkung des DSBI-Enzyms (E) auf diese Rekombinationskassette (H1-S1-P-N-H2) kommt es nach Bildung von Doppelstrangbrüchen an  
45 der Schnittstelle S1 und zur Eliminierung der zwischen H1

und H2 gelegenen Sequenzen. Die Schnittstelle S1 kann auch hinter oder in der Expressionskassette lokalisiert sein.

5 Fig. 3: Bevorzugte Ausführungsform

Sequenzen - hier beispielsweise eine Expressionskassette bestehend aus einem Promotor (P) und einer zu exprimierenden weiteren Nukleinsäuresequenz (N) (beispielsweise einem Selektionsmarker) - können besonders  
10 effizient aus der chromosomalen DNA eliminiert werden, wenn sie von den Homologiesequenzen H1 und H2 flankiert sind und sich vor und hinter der zu deletierenden Nukleinsäuresequenz je eine Schnittstelle (S1 und S2) für ein DSBI-Enzym befindet. Durch Einwirkung des DSBI-Enzyms  
15 (E) auf diese Rekombinationskassette (H1-S1-P-N-S2-H2) kommt es nach Bildung von Doppelstrangbrüchen an den Schnittstellen S1 und S2 und zur Eliminierung der zwischen H1 und H2 gelegenen Sequenzen.

20 Fig. 4: Bevorzugte Ausführungsform

Sequenzen - hier beispielsweise eine Expressionskassette bestehend aus einem Promotor (P) und einer zu exprimierenden weiteren Nukleinsäuresequenz (N) (beispielsweise einem Selektionsmarker) - können quasi spurlos  
25 aus der chromosomalen DNA eliminiert werden, wenn das sie umfassende Rekombinationskonstrukt zuvor beispielsweise durch eine homologe Rekombination in das Wirtgenom insertiert wurde. Dabei wird das Gen, bestehend aus den Sequenzabschnitten T1, H1/2 und T2, unterbrochen. Das  
30 Rekombinationskonstrukt ist flankiert von zwei Teilen des unterbrochenen Gens (T1-H1 bzw. H2-T2), wobei der mittlere Teil (H1 oder H2) dupliziert wurde, um die homologe Rekombination zu erlauben. Durch Einwirkung des DSBI-Enzyms (E) auf die Schnittstellen (S1 und S2)  
35 kommt es zur Induktion von Doppelstrangbrüchen und zur Induktion der homologen Rekombination zwischen den Homologiesequenzen H1 und H2, wodurch zum einen die zwischen H1 und H2 gelegenen Sequenzen deletiert werden, zum anderen das Ausgangsgen wieder hergestellt wird.

40

Fig. 5: Bevorzugte Ausführungsform

Nukleinsäuresequenzen (hier ein Gen mit der Sequenz T1-H1/2-T2 unter Kontrolle eines Promotors P) können induzierbar exprimiert werden, indem das intakte Gen erst  
45 durch Anwendung des Rekombinationssystems rekonstituiert wird. Das Gen, bestehend aus den Sequenzabschnitten T1, H1/2 und T2, ist - beispielsweise durch Insertion von

## 51

Stop-Kodons oder anderen Unterbrechungen des Leserasters" im Rahmen des Rekombinationskonstruktes- inaktiviert. Das Rekombinationskonstrukt ist flankiert von zwei Teilen des unterbrochenen Gens (T1-H1 bzw. H2-T2), wobei der  
5 mittlere Teil (H1 oder H2) dupliziert wurde, um die homologe Rekombination zu erlauben. Durch Einwirkung des DSBI-Enzyms (E) auf die Schnittstellen (S1 und S2) kommt es zur Induktion von Doppelstrangbrüchen und zur  
10 Induktion der homologen Rekombination zwischen den Homologiesequenzen H1 und H2, wodurch zum einen die zwischen H1 und H2 gelegenen Sequenzen deletiert werden, zum anderen das intakte Gen hergestellt wird.

## Fig. 6: Bevorzugte Ausführungsform

15 Die Abbildung stellt ein Verfahren dar, das dem in Fig. 5 beschriebenen gleicht, nur das hier gezielt ein endogenes Gen aktiviert werden soll, indem das Rekombinationskonstrukt beispielsweise durch eine homologe Rekombination eingeführt wird.

20

## Fig. 7a: Ausführungsbeispiel

Die Abbildung verdeutlicht eine konkrete Ausführungsform des in Fig. 6 beschriebenen Verfahrens. Es wird ein  
25 Rekombinationskonstrukt über Agrobakterium vermittelte Transfektion eingeführt. Flankiert von der rechten und der linken "Bordersequenz" (RB bzw. LB) enthält das Konstrukt das unterbrochene Leseraster des GUS-Gens ( $\beta$ -Glucuronidase) unter der Kontrolle des 35S Promotors (P) und des Nopalinsydhase (nos) Terminator. Die mittlere  
30 Region des GUS-Gens (U) wurde dupliziert und stellt die Homologiesequenzen A und B dar. Zwischen diesen Sequenzen liegt als negative Selektionsmarker das *codA*-Gen unter Kontrolle des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S Promoters und des Nopalinsynthase (nos) Terminators,  
35 flankiert von zwei Erkennungssequenzen des DSBI-Enzyms (S1 und S2). Ferner enthält das Rekombinationskonstrukt noch als positiven Selektionsmarker das *BAR*-Gen unter Kontrolle des 35S Promoters (P) und 35S Terminators.

40

Fig.7a verdeutlicht das infolge der Einwirkung des DSBI-Enzyms Entstehen von Doppelstrangbrüchen und der homologen Rekombination zwischen den homologen U-Sequenzen, wodurch zum einen die zwischen den homologen U-Sequenzen  
45 gelegenen Sequenzen deletiert werden, zum anderen das GUS-Gen wieder hergestellt wird. Die Länge des Acc65I-Fragmentes wird dadurch von 7,3 kb auf 3,7 kb verkürzt.



Fig. 7b: Stellt das gleiche wie unter Fig. 7a beschriebene System dar. Fig. 7a verdeutlicht das infolge der Einwirkung des DSBI-Enzyms Entstehen von Doppelstrangbrüchen. Im Unterschied zu Fig. 7a erfolgt hier keine homologe Rekombination, sondern eine illegitime durch "non-homologous end-joining". Aufgrund der beiden Schnittstellen wird zwar der zwischen S1 und S2 gelegene Bereich deletiert, das GUS-Gen wird jedoch nicht wieder hergestellt. Die Länge des Acc65I-Fragmentes wird dadurch von 7,3 kb auf 4,4 kb verkürzt.

Fig. 7c: Die Abbildung stellt nochmals die beiden Endprodukte der unter den Fig. 7a und Fig. 7b beschriebenen Abläufe dar.

A: Ergebnis der homologen Rekombination; Acc65I-Fragment hat eine Länge von 3,7 kb; das mit den Primern OPN13 und OPN14 (verdeutlicht durch die Pfeile) amplifizierte Fragment hat eine Größe von 0,7 kb.

B: Ergebnis der illegitimen Rekombination ("non-homologous end-joining"); Acc65I-Fragment hat eine Länge von 4,4 kb; das mit den Primern OPN13 und OPN14 (verdeutlicht durch die Pfeile) amplifizierte Fragment hat eine Größe von 1,4 kb.

Fig. 8: Bevorzugte Ausführungsform

Vorteilhafterweise umfassen die Rekombinationskassetten sowohl einen positiven als auch einen negativen Selektionsmarker (PS bzw. NS) jeweils unter Kontrolle eines Promotors. Der positive Selektionsmarker ist nützlich, um die Einführung des Konstruktes in das Genom zu erleichtern und nachzuweisen. Der negative Selektionsmarker ist nützlich, um die Deletion des Konstruktes aus dem Genom nachzuweisen. Beide Marker werden effizient aus der chromosomalen DNA eliminiert, wenn sie von den Homologiesequenzen H1 und H2 flankiert sind und sich vor und/oder hinter der zu deletierenden Nukleinsäuresequenz je eine Schnittstelle (S1 und S2) für ein DSBI-Enzym befindet. Durch Einwirkung des DSBI-Enzyms (E) auf diese Rekombinationskassette kommt es nach Bildung von Doppelstrangbrüchen an den Schnittstellen S1 und/oder S2 und zur Eliminierung der zwischen H1 und H2 gelegenen Sequenzen.

Die Einwirkung eines der genannten DSBI-Enzyms bewirkt gezielte Doppelstrangbrüche und induziert die homologe Rekombination zwischen den homologen U-Sequenzen, wodurch zum einen die zwischen den homologen U-Sequenzen

gelegenen Sequenzen deletiert werden, zum anderen das GUS-Gen wieder hergestellt wird.

Fig. 9: Leicht selektionierbare Systeme zur Deletion einer Nukleinsäuresequenz aus der chromosomalen DNA eines Organismus. Die Konstrukte enthalten einen positiven Selektionsmarker (PS) und negativen Selektionsmarker (NS) jeweils unter Kontrolle eines Promotors (P). (B) enthält zusätzlich eine Expressionskassette für das DSBI-Enzym, wobei die Expression bevorzugt unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors (Pi) realisiert wird. (C) Weitere Nukleinsäuresequenzen können enthalten sein. Die Expression des DSBI-Enzyms führt in allen Fällen dazu, dass die DNA Sequenzen, die zwischen den beiden Erkennungssequenzen liegen, eliminiert werden und die homologen Sequenzen rekombinieren. Da die Zellen gleichzeitig einen negativen Selektionsmarker verlieren, können die Zellen mit einer erfolgreich realisierten Deletion durch Selektion identifiziert werden (Gleave AP et al. (1999) Plant Mol Biol. 40:223-235).

Fig. 10: Die Abbildung verdeutlicht die beiden Konstrukte (SI-Konstrukt (A) und SD-Konstrukt (B)), die verwendet wurde, um den Nachweis zu führen, dass mit verschiedenen Restriktionsenzymen die homologe Rekombination durch Doppelstrangbrüche induziert werden kann. Die Konstrukte werden über Agrobakterium vermittelte Transfektion eingeführt. Flankiert von der rechten und der linken "Bordersequenz" (RB bzw. LB) enthalten die Konstrukte das unterbrochene Leseraster des GUS-Gens ( $\beta$ -Glucuronidase) unter der Kontrolle des 35S Promotors (P) und des Nopalinsynthase (nos) Terminator. Die mittlere Region des GUS-Gens (U) wurde dupliziert und stellt die Homologiesequenzen A und B dar. Zwischen diesen Sequenzen liegen im Falle des SI-Konstruktes (A) die Erkennungssequenzen der DSBI-Enzyme I-SceI, I-CpaI, I-CpaII und I-CreI, im Falle des SD-Konstruktes (B) die Erkennungssequenz des I-ChuI Enzyms. Ferner enthalten die Rekombinationskonstrukte noch als positiven Selektionsmarker das BAR-Gen unter Kontrolle eines Promotors (P).

Fig. 11: Repräsentative histochemische Analyse von nach Induktion von Doppelstrangbrüchen erhaltenen Tabakkalli. Blaufärbung (hier Dunkelfärbung) zeigt Expression des  $\beta$ -Glucuronidasegens und damit die Eliminierung des Selektionsmarkers durch homologe Rekombination an. Blau

## 54

(Dunkelfärbungen) sind bei den Kalli in den Vertiefungen A2, A5, A6, B2, C1, C6 und D2 zu sehen.

Fig. 12: PCR Analyse zum Nachweis der homologen Rekombination. PCR mit den Primer OPN13 und OPN14 mit DNA aus Tabakkalli.

In den Spuren 1, 2 und 3 ist das PCR Produkt (Größe 0,7 kb), das homologe Rekombination anzeigt, zu sehen. Die entsprechenden Kalli waren nach histochemischer Färbung Blau, die entsprechenden PCR Banden wurden sequenziert, um zu zeigen, dass das offene Leseraster (ORF) der  $\beta$ -Glucuronidase tatsächlich durch homologe Rekombination restauriert wurde.

Spur 4 und 5: PCR Produkte (1,4 kb) von nicht blau-anfärbaren Kalli bei dem das Transgen durch "non-homologous end-joning" eliminiert wurde.

Fig. 13: Southern Blots, die die vollständige Elimination der entsprechenden Transgensequenz anzeigen. Die Spuren der Blots A bis D beinhalten jeweils:

	Spur	Linie	Beschreibung
25	1	GU.C.USB 1	Ausgangslinie
	2	GU.C.USB 1-61	"non-homologous end-joning"
	3	GU.C.USB 1-83	homologe Rekombination
	4	GU.C.USB 3	Ausgangslinie
	5	GU.C.USB 3-1	"non-homologous end-joning"
30	6	GU.C.USB 3-3	homologe Rekombination
	7	GU.C.USB 7	Ausgangslinie
	8	GU.C.USB 7-14	"non-homologous end-joning"
	9	GU.C.USB 7-34	homologe Rekombination
35	A:	HindIII-verdaute DNA, die mit einer $\beta$ -Glucuronidase spezifischen Probe hybridisiert wurde.	
	B:	HindIII-verdaute DNA, die mit einer <i>codA</i> spezifischen Probe hybridisiert wurde.	
40	C:	Acc65I-verdaute DNA, die mit einer $\beta$ -Glucuronidase spezifischen Probe hybridisiert wurde.	
45	D:	Acc65I-verdaute DNA, die mit einer <i>codA</i> spezifischen Probe hybridisiert wurde.	

Die Analyse zeigt, dass nach Induktion von DNA-

5 „Doppelstrangbrüchen mittels Expression des Restriktionsenzym sowohl mit homologe Rekombination (Spuren 3, 6 und 9) als auch mit illegitime (Spuren 2, 5 und 8) auftreten kann, wobei stets die zwischen den Restriktionsschnittstellen liegende Transgen-sequenz (codA) aus dem Pflanzengenom eliminiert wurde.

### Beispiele

10

#### Allgemeine Methoden:

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agorosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer ALF-Express (Pharmacia, Upsala, Schweden) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

#### Beispiel 1: Klonierung der Homing-Endonukleasen

30

Die offenen Leseraster (ORFs) der Homing Endonukleasen I-CreI (Wang J et al. (1997) Nucleic Acids Res 25: 3767-3776), I-ChuI (Cote V et al. (1993) Gene 129:69-76), I-CpaI (Turmel M et al. (1995a) Nucleic Acids Res 23:2519-2525) und I-CpaII (Turmel M et al. (1995b) Mol. Biol. Evol. 12, 533-545) wurden aus den entsprechenden Chlamydomonas Stämmen kloniert.

Um die optimale Translation des Gens zu gewährleisten wurden die ORFs der Endonukleasen mit der „Leader“-Sequenz eines Pflanzenvirus verbunden (CaMV Gen V, wie es sich bei I-SceI bewährt hat; Puchta H (1993) Nucl Acids Res 21:5034-5040). Auch wurde den ORFs eine Kernlokalisationssequenz (NLS2; SEQ ID NO: 30) vorangestellt um das Protein effizient an den beabsichtigten Wirkungsort zu bringen. Beide Elemente (Leader-Sequenz und Kernlokalisationssequenz) wurden über die PCR durch die verwendeten Oligonukleotid-Primer eingebracht.

## 56

Zur Isolierung der offenen Leseraster (ORFs) der Endukleasen aus *Chlamydomonas* wurden von der Sammlung für Algenkultur in Göttingen (Universität Göttingen. Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Untere Karspüle 2, D-37073 Göttingen) die Algenkulturen *Chlamydomonas reinhardtii*/Smith (Stamm Nr. 11-32b), *Chlamydomonas applanata*/Lucksch (Stamm Nr.: 11-9) und *Chlamydomonas segrisi*/King (Stamm Nr.: 9.83) bezogen. Die Kulturen wurden mit Hilfe einer Schüttelkultur in MS Medium angezogen und DNA mit Hilfe des DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen.

Aus einer Probe der Algenkultur 11-32b *Chlamydomonas reinhardtii*/Smith wurde mit Hilfe der Oligonukleotide OPN1 und OPN2 (SEQ ID NO: 11 und 12) der ORF von I-CreI (GenBank Acc.-No.: X01977) amplifiziert.

OPN1 (SEQ ID NO: 11):

5'-CGG CTC GAG CTA CGG GGA CGA TTT CTT TTT TTC AC- 3'

OPN2 (SEQ ID NO: 12):

5'- CGG CTC GAG TAC CTA GAA TAC AAA GAA GAG GAA GAA GAA ACC TCT  
ACA GAA GAA GCC ATG GGT CCA AAG AAA AAG AGA AAG GTT ATC AT GAA  
TAC AAA ATA TAA TAA AGA GTT CTT ACT C 3'

Für die PCR-Reaktion wurden 2 µl (entsprechend ungefähr 100 ng DNA) der DNA-Präparation eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 50 µl werden gemäß den Angaben des Herstellers (Life Technologies) zusammengegeben:

5 µl 10X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]  
1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl 10 mM dNTP Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)  
1 µl Primer OPN1 (10 µM)  
1 µl Primer OPN2 (10 µM)  
0,4 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl)  
2 µl DNA-Präparation  
38,1 µl autoklaviertes, destilliertes Wasser

Das Reaktionsgemisch wird mit ca. 50 µl Silikonöl überschichtet und nachfolgendem Temperaturprogramm ausgesetzt (Thermocycler: MWG Biotech Primus HT; MWG Biotech, Deutschland):

1 Zyklus mit 180 sec bei 95°C  
30 Zyklen mit 92°C für 60 sec, 54°C für 60 sec und 72°C für 3 min.  
1 Zyklus mit 72°C für 5 min.

## 57

Das PCR-Fragment wurde über Agarosegelelektrophorese und unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt und in den pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, USA) kloniert. Anschließend wurde eine Sequenzanalyse mit dem DNA-Sequenzierungsgerät ALF-Express (Pharmacia, Upsala, Schweden) durchgeführt. Die Sequenz ist in SEQ ID NO: 5 dargestellt.

Analog wie für I-CreI wurde auch die Klonierung des ORF von I-CpaI aus der Algenkultur 9.83 Chlamydomonas segrisi/King (Genbank Acc.-No.: L36830) durchgeführt. Für die PCR wurden die Oligonukleotiden OPN3 und OPN4 verwendet. Die Sequenz ist in SEQ ID NO: 7 dargestellt.

15 OPN3 (SEQ ID NO: 13):

5'-CGG CTC GAG TAC CTA GAA TAC AAA GAA GAG GAA GAA GAA ACC TCT  
ACA GAA GAA GCC ATG GGT CCA AAG AAA AAG AGA AAG GTT ATC ATG GAC  
ATT AAT CCT CAA TGG ATT ACA GG- 3'

20 OPN4 (SEQ ID NO: 14):

5'-CGG CTC GAG TTA CTC GCC AGT TTC TTC AAA ACG-3'

Analog wie für I-CreI wurde auch die Klonierung des ORF von I-CpaII durchgeführt (Genbank Acc.-No.: L39865). Dazu wurde eine Probe der Algenkultur 9.83 Chlamydomonas segrisi/King verwendet. Für die PCR wurden die Oligonukleotiden OPN5 und OPN6 verwendet. Die Sequenz ist in SEQ ID NO: 9 dargestellt.

OPN5 (SEQ ID NO: 15):

30 5'-CGG CTC GAG TAC CTA GAA TAC AAA GAA GAG GAA GAA GAA ACC TCT  
ACA GAA GAA GCC ATG GGT CCA AAG AAA AAG AGA AAG GTT ATC ATG ACC  
GAT TCT AAA TCT AGA AAC AAC-3'

OPN6 (SEQ ID NO: 16):

35 5'-CGG CTC GAG CTA AAG GTG GCC TTT ATT GCC ATC AG-3'

Analog wie für I-CreI wurde auch die Klonierung des ORF von I-ChuI aus der Algenkultur Nr. 11-9 Chlamydomonas applanata/Lucksch (Genbank Acc.-No.: L06107) durchgeführt. Für die PCR wurden die Oligonukleotiden OPN7 und OPN8 verwendet. Die Sequenz ist in SEQ ID NO: 3 dargestellt.

OPN7 (SEQ ID NO: 17):

45 5'-CGG CTC GAG TAC CTA GAA TAC AAA GAA GAG GAA GAA GAA ACC TCT ACA  
GAA GAA GCC ATG GGT CCA AAG AAA AAG AGA AAG GTT ATC ATG TCA TTA  
ACA CAA CAA CAA AAA GAC-3'

OPN8 (SEQ ID NO: 18):

5'-CGG CTC GAG CTA AAG GTG GCC TTT ATT GCC ATC AG-3')

Der ORF der einzelnen Homing-Endonukleasen (mit dem Kernlokali-  
5 sationssignal) wurde jeweils aus den jeweiligen pGEM-T Easy  
Vector durch Sall Restriktionsverdau herausgeschnitten, gel-  
elektrophoretisch aufgereinigt und jeweils in die Sall Restrik-  
tionsschnittstelle des binären Vektors pBinAR (Höfgen und Will-  
mitzer (1990) Plant Science 66:221-230) kloniert. Die Expression  
10 der einzelnen Enzyme erfolgt unter Kontrolle des 35S Promotors  
und des Octopine Synthase Terminators.

Der binäre I-SceI Expression Vector pCISceI (Puchta H et al.  
(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5055-5060) enthält einen  
15 synthetischen I-SceI ORF unter der Kontrolle des CaMV 35S  
Promotors (Puchta H et al. (1993) Nucl. Acids Res 21: 5034-5040)  
zwischen den T-DNA "Borders".

Alle fünf Plasmide wurden in E. coli vermehrt, mit dem QIAfilter  
20 Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und mittels  
Elektroporation in den Agrobakteriumstamm C58 überführt.

#### Beispiel 2: Herstellung des Konstruktes pGU.I.USB

25 Zur Konstruktion der Rekombinationssubstrate wurde das Plasmid  
pGU.US (Tinland B et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
91:8000-8004) verwendet. Das Plasmid enthält im Bereich der T-DNA  
zwei überlappende Hälften des  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) Gens, die  
eine Überlappung von 557 bp aufweisen. Zwischen den GUS Sequenzen  
30 ist in eine unikale XbaI Schnittstelle ein Hygromycin-Gen inte-  
griert.

In einem ersten Schritt wurde das BAR Gen mit Promotor und  
Terminatorsequenzen als isoliertes HindIII Fragment aus dem  
35 Vektor pRC (Puchta H et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA  
93:5055-5060) herausgeschnitten, über Agarosegelelektrophorese  
vom der Vektorsequenz abgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten, mit  
Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutsch-  
land) isoliert und danach in die unikale HindIII Schnittstelle  
40 von pGU.US inseriert. Dazu wurde zuvor der Vektor pGU.US mit  
HindIII geschnitten und mit Alkalischer Phosphatase (Calf  
Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP), New England Biolabs,  
Frankfurt, Deutschland) zur Verhinderung der Rezirkularisierung  
dephosphoryliert. Der entstehende Vektor trägt die Bezeichnung  
45 pGU.US-BAR.

## 59

In dem Vektor pNE3 (Stougaard J (1993) Plant J 3:755-761) wurde zunächst die XbaI Schnittstelle durch eine "Klenow-filling-in" Reaktion entfernt. Aus dem resultierenden Vektor pNE3-XBA wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimer ONP9 (SEQ ID NO: 16) und ONP10 (SEQ ID NO: 17) das offene Leseraster (ORF) des negativen Selektionsmarkergens Cytosindeaminase (*codA*) unter der Kontrolle des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S Promoters und des Nopalinsynthase (*nos*) Terminator amplifiziert. Durch die verwendeten Oligonukleotidprimer OPN9 und OPN10 wurde an beiden Enden des Amplifikats je eine I-SceI Schnittstelle (in Fettdruck in den unten angegebenen Sequenzen hervorgehoben) und eine NotI bzw. XbaI Schnittstelle angefügt.

OPN9 (SEQ ID NO: 19):

15 5'-CGG CTC TAG AGC GGC CGC CTA GGG ATA ACA GGG TAA TAG AAT CCC  
ACA AAA ATC TGA GCT TAA CAG 3'

OPN10 (SEQ ID NO: 20):

5'-CGG CTC TAG ACT ATT ACC CTG TTA TCC CTA GGC CCG ATC TAG TAA  
20 CAT AGA TGA CAC CGC GCG CG 3'

Für die PCR-Reaktion wurden 2 µl (entsprechend ungefähr 100 ng) einer Plasmidpräparation von pNE3-XBA eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden gemäß den Angaben des Herstellers (Life Technologies) zusammengegeben:

5 µl 10X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]  
1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µl 10 mM dNTP Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)  
30 1 µl Primer OPN1 (10 µM)  
1 µl Primer OPN2 (10 µM)  
0,4 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl)  
2 µl Plasmidpräparation von pNE3-XBA  
38,1 µl autoklaviertes, destilliertes Wasser  
35

Das Reaktionsgemisch wurde mit ca. 50 µl Silikonöl überschichtet und nachfolgendem Temperaturprogramm ausgesetzt (Thermocycler: MWG Biotech Primus HT; MWG Biotech, Deutschland):

40 1 Zyklus mit 180 sec bei 95°C  
25 Zyklen mit 92°C für 60 sec, 54°C für 60 sec und 72°C für 3 min.  
1 Zyklus mit 72°C für 5 min.

45



## 60

- Das PCR-Produkt wurde mit XbaI und NotI verdaut. Der Vektor pGU-US-BAR wurde ebenfalls mit XbaI und NotI verdaut (was zur Deletion des Hygromycin Markergens führte), das Vektorfragment über Agarosegelelektrophorese und unter Verwendung des QIAquick® Gel
- 5 Extraction Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Die Ligation von verdautem PCR-Fragment und Vektor führte zu dem binären Vektor pGU.C.USB (siehe Fig. 7a). Der Vektor enthält auf einer T-DNA zwischen zwei I-SceI Schnittstellen ein Markergeng (die Cytosindeminase (codA)). Die I-SceI Schnittstellen werden
- 10 nach außen hin von homologen Sequenzbereichen von 557 bp des  $\beta$ -Glucuronidasegens (GUS) flankiert. Das GUS-Gen dient als Marker der homologen Restauration (Swoboda P et al. (1994) EMBO J 13:481- 489). Wird das Gen durch homologe Rekombination restauriert, kann die Expression histochemisch nachgewiesen werden.
- 15 Die Elimination des Markergens führt zu 5-FC (Fluorocytosin) resistenten Tabakzellen die dann zu Kalli regeneriert werden können (Salomon S und Puchta H (1998) EMBO J 17:6086-6095).

## Beispiel 3: Pflanzentransformation mit pGU.I.USB

20

*Nicotiana tabacum* L. cv. Petite Havana Line SR1 Sämlinge wurden mit dem Agrobacterium Stamm C58 transformiert, der den binären Vector pGU.C.USB enthielt.

- 25 Dazu wurden, wie bei Puchta H. (1999) Methods Mol Biol 113: 447-451, beschrieben, Samen unter sterilen Bedingungen auf angefeuchteten Filterpapier ausgebracht und die Sämlinge nach 2 Wochen geerntet (25°C, 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkel Rhythmus).

30

- Zur Inokulation wurde der Agrobakterienstamm, der das binäre Plasmid zur Transformation enthielt, zuerst über Nacht in einer Schüttelkultur bei 28°C in YEB Medium angezogen. Die Agrobakteriensuspension wurde dann für 10 Minuten bei 15.000 g ab-
- 35 zentrifugiert und die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen, so dass die endgültige optische Dichte der Suspension einem Wert von ungefähr 0,5 entsprach. In einem Reaktionsgefäß wurden dann unter sterilen Bedingungen die Sämlinge in die Bakteriensuspension geben und in einem sterilen Exsikkator ein Vakuum von 0,15 at
- 40 angelegt. Nach 10 Minuten wurden die Sämlinge dann auf MS Platten ausgebracht, die BAP (6-Benzylaminopurin 5 µg/ml) und NAA (1-Naphthalenessigsäure 0,5 µg/ml) enthielten, und für 3 Tage in einer Wachstumskammer (25°C, 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkel Rhythmus) belassen. Die Sämlinge wurden danach auf MS Medium
- 45 gebracht, das neben NAA und BAP noch Phosphinotricin (100 µg/ml), Vancomycin (1 µg/ml) und Cefotaxin (0,5 µg/ml) enthielt. Alle 10 Tage wurden die Sämlinge auf frisch-bereite Platten über-

## 61

tragen. Aus den entstehenden Kalli bildeten sich mit der Zeit Sprösslinge. Diese Sprösslinge wurden - sobald sie eine gewisse Größe erreicht hatten (1 bis 2 cm) - vom Kallusmaterial abgeschnitten und in Magentaboxen eingesetzt, die MS Medium mit 5 Phosphinotricin, Vancomycin und Cefotaxin enthielten (Konzentrationen wie oben). Die Sprösslinge bildeten nach kurzer Zeit Wurzeln und wurden nach 2 bis 4 Wochen in Erde umgesetzt. Im Gewächshaus wurden die Pflanzen zum Blühen gebracht, geselbstet und gewartet bis die entstandenen Samen in den Kapseln reiften. 10 Danach wurden die Samen für die Segregationsanalysen auf MS Medium, das 300 µg Phosphinotricin (zur positiven Selektion) bzw. 500 µg 5-FC (Fluorocytosin; zur negativen Selektion) per ml enthielt, ausgebracht. Durch Ermittlung des Verhältnisses der resistenten zu sensitiven Sämlingen (3:1 bei positiver Selektion 15 bzw. 1:3 bei negativer Selektion) konnte gezeigt werden, dass bei den drei ausgewählten Linien die Rekombinationskonstrukte an einem Locus inseriert waren.

Beispiel 5: Induktion der Gendeletion durch Einführung des DSBI-  
20 Enzyms I-SceI

In den Experimenten wurden F1 Sämlinge der transgenen Linien GU.C.USB 1, 3 and 7, die je eine Kopie der im Fig. 2 dargestellten T-DNA GU.C.USB enthielten, mit einem I-SceI transient 25 exprimierenden Agrobakterienstamm, der das Plasmid pCISceI enthielt (Puchta H et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 5055-5060), auf die oben beschriebene Art (siehe auch Puchta, 1999b) inokuliert. Die Sämlinge wurden nach 3 Tagen auf MS Medium mit BAP und NAA (Konzentrationen wie oben) Medium auf das 30 gleichen Medium zusätzlich in Gegenwart von 100 µg 5-FC and 100 µg Phosphinotricin per ml inkubiert, um Pflanzenzellen zu detektieren, bei denen das zu eliminierende Markergen (in diesem Falle das *codA* Gen) deletiert wurde. Die auf dem Medium wachsenden Kalli wurden nach 6 Wochen in zwei Teile geteilt, ein Teil wurde 35 zur Regeneration von Sprossachsen verwendet der andere wurde zur Isolierung von DNA und zum  $\beta$ -Glucuronidase Assay verwendet. Die erhaltenen 5-FC resistenten transgenen Kalli wurden auf homologe Rekombinationsereignisse hin mittels histochemischer Färbung untersucht. Dabei deutet eine Blaufärbung eine Restauration des 40 Kallus an (s. Fig. 11).

Die histochemische Färbung der Kalli wurde wie bei Swoboda et al., 1994 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Kalli in Färbelösung (0.3 mg X-Gluc [Duchefa, Harlem, NL] pro ml 100 mM 45 Natriumphosphatpuffer pH 7,0; 0,1 % Triton; 0,05 %  $\text{NaN}_3$ ) gebracht. Es wurde im Exsikkator für 15 Minuten Vakuum angelegt und anschließend wurden die Kalli in der Lösung für 48 Stunden bei 37°C

## 62

inkubiert. Nach Abgießen der Färbelösung wurde durch mehrmaliges Schütteln in 80% Ethanol das verbleibende Chlorophyll aus dem Pflanzenmaterial entfernt. Die erhaltene Blaufärbung zeigte die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase an.

5

Bei ungefähr einem Viertel der Fälle wurde das Markergen durch homologe Rekombination erfolgreich eliminiert (Fig. 11, Tabelle 2).

10 Tabelle 2. Zahl der 5-FC resistenten Tabak Kalli nach transienter DSB Induktion

15	Transgene Line	Sämlinge	resist. Kalli	GUS positiv	GUS positiv (% von resist. Kalli)
	GU.C.USB 1	290	56	22	39
	GU.C.USB 3	490	90	24	27
	GU.C.USB 7	370	59	11	19

20

Molekulare Analysen bestätigten den Sachverhalt: Da die Linie GU.C.USB 1 eine einzelne Kopie des Transgens enthielt, wurden die Kalli direkt mittels PCR auf Rekombinationsereignisse hin untersucht.

25

Eine statistisch ausgewählter Teil der Kalli wurde dann mittels PCR auf der molekularen Ebene untersucht. Durch die molekulare Analyse mit dem Primerpaaren

30 OPN11 (SEQ ID NO: 21)

5'- CGG AAG CTT CGT CAC CAA TCC CAA TTC GAT CTA C - 3' und

OPN12 (SEQ ID NO: 22)

5'- CGG AAG CTT CCA CTT GCA AAG TCC CGC TAG TGC C - 3'

35

konnten die neugebildeten Verknüpfungsstellen aus dem Tabakgenom isoliert werden (Fig. 12; Tabelle 3).

Tabelle 3. Molekulare Analyse von Rekombinationsereignissen

40 mittels PCR

45	Transgene Linie	Kalli	PCR Fragment(e)		
			0,7 kb	1,4 kb	Keines/anders
	GU.C.USB 1	30	10	12	7

Es wurden drei 0,7 kb PCR Fragmente ausgewählt und sequenziert. Die Sequenzierung ergab in allen drei Fällen die funktionelle Sequenz des  $\beta$ -Glucuronidasegens, d.h. die Restaurierung des Gens ist tatsächlich durch homologe Rekombination fehlerfrei erfolgt.

5

Bei der Sequenzierung von fünf 1,4 kb PCR Banden ergab sich, dass diese Banden nach Ausschneiden des codA Genes durch Reparatur der beiden I-SceI Schnittstellen entstanden sind (durch "non-homologous end-joining" NHEJ), ohne dass homologe Rekombination erfolgte. Dabei kam es meist zu kleineren Deletionen an der I-SceI Schnittstelle.

Per Southern Blot wurde gezeigt, dass es bei den Rekombinanten mit den 0,7 bzw. 1,4 kb Banden - wie erwartet zur vollständigen Eliminierung der zwischen den I-SceI Schnittstellen liegenden Sequenz kam. Es konnte keinerlei codA spezifische DNA mehr im Genom der regenerierten Pflanzen nachgewiesen werden (Fig. 13 B und D Spuren 2 und 3).

20 Die DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Hilden) isoliert. Zur Detektion der Rekombinationsprodukte wurde genomische DNA mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide OPN13 und OPN14 analysiert.

25 OPN13 (SEQ ID NO: 23):

5'-CGG AAG CTT CGT CAC CAA TCC CAA TTC GAT CTA C - 3'

OPN14 (SEQ ID NO: 24):

5'-CGG AAG CTT CCA CTT GCA AAG TCC CGC TAG TGC C - 3'

30

5  $\mu$ l 10X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]  
1,5  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1  $\mu$ l 10 mM dNTP Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)  
1  $\mu$ l Primer OPN1 (10  $\mu$ M)  
35 1  $\mu$ l Primer OPN2 (10  $\mu$ M)  
0,4  $\mu$ l Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l)  
2  $\mu$ l DNA-präparation  
38,1  $\mu$ l autoklaviertes, destilliertes Wasser

40 Das Reaktionsgemisch wird mit ca. 50  $\mu$ l Silikonöl überschichtet und nachfolgendem Temperaturprogramm ausgesetzt (Thermocycler: MWG Biotech Primus HT; MWG Biotech, Deutschland):

1 Zyklus mit 180 sec bei 95°C  
45 30 Zyklen mit 92°C für 60 sec, 54°C für 60 sec und 72°C für 3 min.  
1 Zyklus mit 72°C für 5 min.

Die Sequenzierung der PCR Produkte wurde mit dem "ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit" (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

- 5 Zum Southern Blotting wurde die DNA mit HindIII oder Acc65I geschnitten und einer Elektrophorese in einem 0.8 % Agarosegel unterworfen. Die im Gel befindliche DNA wurde dann mittels Kapillarblottings, wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, auf die Hybridisierungsmembran 'Hybond N' (Amersham, Little Chalfont, UK) übertragen. Für die molekulare Hybridisierung wurden *codA* bzw. GUS spezifische Genfragmente aus den Ausgangsplasmiden isoliert (XbaI/XhoI Fragment als PNE3; Stougaard, 1993 und KpnI/SacI Fragment aus pGUS23, Puchta and Hohn, 1991, isoliert mit dem QIAquick Gel Extraction Kits [Qiagen, Hilden]) und mit Hilfe eines "Random Priming Labeling Kit" (Megaprime DNA labeling system RPN1607, Amersham, Little Chalfont, UK) und [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (Amersham, Little Chalfont, UK) markiert. Die Hybridisierungen wurden bei 65° C durchgeführt.
- 20 Da bei den Linien GU.C.USB 3 und GU.C.USB 7 jeweils 2 genetisch gelinkte Transgenkopien integriert waren, wurden bei diesen Linien eine repräsentative Anzahl von Pflanzen aus Kallus regeneriert, DNA gewonnen und dann per Southern Blot untersucht (Tabelle 4).
- 25 Bei Acc65I deutet die Anwesenheit einer GUS-spezifischen Bande von 3,7 kb auf eine homologe Rekombination, die einer 4,4 kb Bande auf ein NHEJ-Ereignis ("non-homologous end-joining"; NHEJ) hin (Fig. 7b und c; Fig. 13 C).
- 30 Tabelle 4. Molekulare Analyse von Rekombinationsereignissen mittels Southern Blots

35	Transgene Linie	Kalli	Acc65I-Fragment (kb)		
			3,7	4,4	Deletion
	GU.C.USB 3	39	6	18	15
	GU.C.USB 7	14	2	5	7

- 40 Interessanterweise wurde in allen Fällen die gleiche Art von Verknüpfung bei beiden Transgenkopien gefunden. Es traten also - mit anderen Worten - entweder nur homologe Rekombinationen oder nur NHEJ-Ereignisse auf. In keinem Fall lagen beide Möglichkeiten parallel vor, d.h. beispielsweise eine homologe Rekombination
- 45 an dem einem Transgen und ein NHEJ-Ereignis an dem anderen.

Es wurden bei beiden Linien auch PCR Analysen durchgeführt und jeweils drei 0,7 kb große PCR Fragmente ausgewählt und sequenziert. Die Sequenzierung ergab in allen drei Fällen die funktionelle Sequenz des  $\beta$ -Glucuronidasegens, d.h. die Restaurierung des Gens ist tatsächlich durch homologe Rekombination erfolgt.

Bei der Sequenzierung von insgesamt neun 1,4 kb langer PCR Banden der zwei Linien ergab sich weiterhin, dass diese Banden tatsächlich nach Ausschneiden des *codA* Genes durch Reparatur der beiden I-SceI Schnittstellen entstanden sind (durch "non-homologous end-joining" NHEJ). Dabei kam es wiederum meist zu kleineren Deletionen an der I-SceI Schnittstelle.

Per Southern Blot wurde gezeigt, dass es bei dem Rekombinanten wie erwartet zur vollständigen Eliminierung der zwischen den I-SceI Schnittstellen liegenden Sequenz kam. Es konnte keinerlei *codA* spezifische DNA mehr im Genom der regenerierten Pflanzen nachgewiesen werden (Fig. 13 B und D Spuren 5, 6 und 8, 9).

20

#### Beispiel 5:

Es wurden verschiedene transgene Tabakpflanzenlinien hergestellt, die zwischen den Hälften des  $\beta$ -Glucuronidasegens (Anordnung wie oben beschrieben) neben einer I-SceI Schnittstelle mittels Klonierung synthetischer Oligonukleotide auch Schnittstellen für die oben aufgeführten Restriktionsenzyme aufwiesen (Fig. 10). Sämlinge dieser Tabaklinie wurden dann jeweils im direkten Vergleich mit Agrobakterien inokkuliert, die entweder I-SceI oder das entsprechende Enzym in Pflanzenzellen exprimieren können. Die entstehenden Kalli wurden dann nach 2 Wochen histochemisch gefärbt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Das Plasmid pGU.C.US.B wurde mit I-SceI geschnitten, so dass das *codA* Gen aus dem Plasmid herausgeschnitten wurde. Die verdaute DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die größere Bande wurde ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und anschließend ligiert und in *E. coli* transformiert. Das erhaltene Plasmid wurde dann mit XbaI geschnitten.

Die komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide OPN25 und OPN26 wurden durch kurzes Erhitzen auf 92°C und abschließendes Abkühlen in eine doppelsträngige Form gebracht und daran anschließend mit dem XbaI geschnittenen Plasmid ligiert. Das erhaltene SI-Konstrukt (pSI) enthält die Schnittstellen für I-SceI, I-CpaI, I-CpaII und I-CreI (s. Fig. 10 (A)).

OPN15 (SEQ ID NO: 25):

5'-CTA GTA CAA AAC GTC GTG AGA CAT TTT AAT CTG AAG GTT TGG CAC  
CTC GAT GTC GGC TCA TC-3'

5 OPN16 (SEQ ID NO: 26):

5'-CTA GGA TGA GCC GTC ATC GAG GTG CCA AAC CTT CAG ATT AAA ATG  
TCT CAC GAC GTT TTG TA-3'

Die komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide OPN27 und  
10 OPN28 wurden durch kurzes Erhitzen auf 92°C und abschließendes  
Abkühlen in eine doppelsträngige Form gebracht und daran  
anschließend mit dem XbaI geschnittenen Plasmid ligiert. Das  
erhaltene SD-Konstrukt (pSD) enthält die Schnittstellen für  
I-SceI und I-ChuI (s. Fig. 10 (B)).

15

OPN17 (SEQ ID NO: 27):

5'-CTA GTC CGA AAA CGC CGT GAG ACA TAT TGG TTA CGA TCC TAA GGT  
AGC GAA ATT CAC CCG GTA ACT CTG TGC CAG-3'

20 OPN18 (SEQ ID NO: 28):

5'-CTA GCT GGC ACA GAG TTA CCG GGT GAA TTT CGC TAC CTT AGG ATC  
GTA ACC AAT ATG TCT CAC GGC GTT TTC GGA-3'

Es wurden wie bereits weiter oben beschrieben mittels Agro-  
25 bacterium Transformation transgene Tabakpflanzen mit beiden  
Konstrukten hergestellt. Dabei wurden für die weiteren Versuche  
Linien verwendet, die an nur einem Locus transgene Sequenzen  
enthielten. Diese Linien wurden durch die 3:1 Segregation in  
Phosphinotricin- resistente und nicht resistente Pflanzen er-  
30 mittelt. Die geselbsteten Sämlinge wurden dann mit Agrobakterium-  
stämmen inokuliert, die eines der vier Konstrukte zur Expression  
der Restriktionsendonukleasen bzw. als Vektorkontrolle das  
Plasmid BinAR oder als positiv Kontrolle eine 1:1 Mischung aus  
BinAR und CISce-I enthielten. Die Inokulationen wurden wie oben  
35 beschrieben durchgeführt (Puchta H (1999) Methods Mol. Biol.  
113:447-451) und zur Selektion wurden die Sämlinge auf MS Medium  
mit 100 µg Kanamycin pro ml, das auch BAP und NAA, Vancomycin  
und Cefotaxin (Konzentrationen wie oben) enthielt über mehrere  
Wochen kultiviert. Die entstehenden Kalli wurden dann, wie oben  
40 beschrieben einer histochemischen  $\beta$ -Glucuronidasefärbung unter-  
worfen.

Mit allen vier getesteten Restriktionsenzymen konnte eine  
Induktion der homologen Rekombination in der gleichen Größen-  
45 ordnung hervorgerufen werden wie mit I-SceI (das hier in einer  
Coinokulation mit dem Selektionsvektor pBinAR [AR] eingesetzt  
wurde) (Tabelle 5). Damit ist gezeigt, dass bei Verwendung von

## 67

beliebigen Restriktionsendonukleasen effizient homologer Rekombination induziert werden kann.

Tabelle 5. Induktion der homologen Rekombination in Pflanzen 5 mittels verschiedener Endonukleasen I-CreI, I-CpaI, I-CpaII und I-ChuI. [Sektoren/Kalli] meint die Anzahl von blaugefärbten Arealen in den resistenten Kalli.

Transgene Linie	Enzym	Sektoren/Kalli	Verhältnis
SI5	I-SceI/AR	42/31	1.35
	I-CreI	77/50	0.54
	I-CpaII	51/50	1.02
SI2	I-SceI/AR	8/9	0.89
	I-CreI	40/18	2.22
	I-CpaII	9/20	0.45
SI2	I-CpaI	144/106	1.36
SD2	I-ChuI	166/100	1.66



## Patentansprüche

1. Rekombinationssystem, dadurch gekennzeichnet, dass

5 I) ein transgenes Rekombinationskonstrukt insertiert in die chromosomale DNA eines eukaryotischen Organismus, das eine Sequenz enthält bestehend in 5'/3'-Richtung aus

a1) einer ersten Homologiesequenz A und

10 b1) mindestens eine Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und

15 a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologiesequenzen A und B eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten,

und

20 II) ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz (b) zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen oder eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Enzym geeignet zur  
25 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz (b)

in einer eukaryotischen Zelle oder Organismus zusammen vorliegen.

30 2. Rekombinationssystem gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Rekombinationskonstrukt wie folgt aufgebaut ist

35 a1) einer ersten Homologiesequenz A und

b1) einer Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von  
~~DNA-Doppelstrangbrüchen und~~

40 c) einer weiteren Nukleinsäuresequenz und

a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologiesequenzen A und B eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe  
45 Rekombination zu gewährleisten.

69

3. Rekombinationssystem gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Rekombinationskonstrukt wie folgt aufgebaut ist
- 5 a1) einer ersten Homologiesequenz A und
- b1) einer ersten Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und
- 10 c) einer weiteren Nukleinsäuresequenz und
- b2) einer zweiten Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und
- 15 a1) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologiesequenzen A und B eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten.
- 20 4. Rekombinationssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Rekombinationskonstrukt oder die weitere Nukleinsäuresequenz mindestens eines der Elemente beinhaltet ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 25 i) Positiven Selektionsmarkern
- ii) Negativen Selektionsmarkern
- iii) Reportergenen
- 30 iv) Replikationsursprüngen
- v) Multiple Klonierungsregionen
- 35 vi) "Border"-Sequenzen für Agrobakterium-Transfektion
- vii) Sequenzen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen
- 40 viii) Expressionskassette für ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen
- 45

5. Rekombinationssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Restriktionsendonukleasen, Homing-Endonukleasen, Gruppe II Intron Endonukleasen, Rekombinasen, Transposasen, Chimäre Nukleasen.
6. Rekombinationssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgewählt ist aus der Gruppe der Homing-Endonukleasen bestehend aus F-SceI, F-SceII, F-SuvI, F-TevI, F-TevII, I-AmaI, I-AniI, I-CeuI, I-CeuAIIP, I-ChuI, I-CmoEI, I-CpaI, I-CpaII, I-CreI, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIVP, I-CsmI, I-CvuI, I-CvuAIP, I-DdiI, I-DdiII, I-DirI, I-DmoI, I-HmuI, I-HmuII, I-HspNIP, I-LlaI, I-MsoI, I-NaaI, I-NanI, I-NclIP, I-NgrIP, I-NitI, I-NjaI, I-Nsp236IP, I-PakI, I-PboIP, I-PcuIP, I-PcuAI, I-PcuVI, I-PgrIP, I-PobIP, I-PorI, I-PorIIP, I-PpbIP, I-PpoI, I-SPBetaIP, I-ScaI, I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SceVI, I-SceVII, I-SexIP, I-SneIP, I-SpomCP, I-SpomIP, I-SpomIIP, I-SquIP, I-Ssp6803I, I-SthPhiJP, I-SthPhiST3P, I-SthPhiS3bP, I-TdeIP, I-TevI, I-TevII, I-TevIII, I-UarAP, I-UarHGPA1P, I-UarHGPA13P, I-VinIP, I-ZbiIP, PI-MtuI, PI-MtuHIP, PI-MtuHIIP, PI-PfuI, PI-PfuII, PI-PkoI, PI-PkoII, PI-PspI, PI-Rma43812IP, PI-SPBetaIP, PI-SceI, PI-TfuI, PI-TfuII, PI-ThyI, PI-TliI und PI-TliII.
7. Rekombinationssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgewählt ist aus der Gruppe der Homing-Endonukleasen bestehend aus den Enzymen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10.
8. Rekombinationssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 7, ~~dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion~~ von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen unter Verwendung einer Expressionskassette realisiert wird, die eine für das besagte Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz beinhaltet.

9. Rekombinationssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen unter Verwendung einer Expressionskassette realisiert wird, die eine für das besagte Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 oder 9 beinhaltet.
10. Verfahren zum Entfernen einer DNA-Sequenz aus der chromosomalen DNA einer eukaryotischen Zelle oder Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass
- I) ein transgenes Rekombinationskonstrukt insertiert in die chromosomale DNA eines eukaryotischen Organismus, das eine Sequenz enthält bestehend in 5'/3'-Richtung aus
- a1) einer ersten Homologiesequenz A und
- b1) mindestens eine Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und
- a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologiesequenzen A und B eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten,
- und
- II) ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz (b) zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen
- in einer eukaryotischen Zelle oder Organismus zusammengebracht werden, und die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie die homologe Rekombination zwischen den Homologiesequenzen A und B erfolgt.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Rekombinationskonstrukt wie folgt aufgebaut ist
- a1) einer ersten Homologiesequenz A und
- b1) einer Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und

- c) einer weiteren Nukleinsäuresequenz und
- a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologiesequenzen A und B eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Rekombinationskonstrukt wie folgt aufgebaut ist
- a1) einer ersten Homologiesequenz A und
- b1) einer ersten Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und
- c) einer weiteren Nukleinsäuresequenz und
- b2) einer zweiten Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und
- a2) einer zweiten Homologiesequenz B, wobei die Homologiesequenzen A und B eine ausreichende Länge und ausreichende Homologie aufweisen, um eine homologe Rekombination zu gewährleisten.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Rekombinationskonstrukt oder die weitere Nukleinsäuresequenz mindestens eines der Elemente beinhaltet ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- i) Positiven Selektionsmarkern
- ii) Negativen Selektionsmarkern
- iii) Reportergen
- iv) Replikationsursprüngen
- v) Multiple Klonierungsregionen
- vi) "Border"-Sequenzen für Agrobakterium-Transfektion
- vii) Sequenzen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen

viii) Expressionskassette für ein Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

- 5
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Restriktionsendonukleasen, Homing-Endonukleasen, Rekombinasen, Transposasen, Chimäre Nukleasen.
- 10
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgewählt ist aus der Gruppe der Homing-Endonukleasen bestehend aus
- 15
- 20 F-SceI, F-SceII, F-SuvI, F-TevI, F-TevII, I-AmaI, I-AniI, I-CeuI, I-CeuAIIP, I-ChuI, I-CmoI, I-CpaI, I-CpaII, I-CreI, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIVP, I-CsmI, I-CvuI, I-CvuAIP, I-DdiI, I-DdiII, I-DirI, I-DmoI, I-HmuI, I-HmuII, I-HspNIP, I-LlaI, I-MsoI, I-NaaI, I-NanI, I-NclIP, I-NgrIP, I-NitI, I-NjaI, I-Nsp236IP, I-PakI, I-PboIP,
- 25
- I-PcuIP, I-PcuAI, I-PcuVI, I-PgrIP, I-PobIP, I-PorI, I-PorIIP, I-PpbIP, I-PpoI, I-SPBetaIP, I-ScaI, I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SceVI, I-SceVII, I-SexIP, I-SneIP, I-SpomCP, I-SpomIP, I-SpomIIP, I-SquIP, I-Ssp6803I, I-SthPhiJP, I-SthPhiST3P, I-SthPhiS3bp, I-TdeIP,
- 30
- I-TevI, I-TevII, I-TevIII, I-UarAP, I-UarHGPA1P, I-UarHGPA13P, I-VinIP, I-ZbiIP, PI-MtuI, PI-MtuHIP, PI-MtuHIIP, PI-PfuI, PI-PfuII, PI-PkoI, PI-PkoII, PI-PspI, PI-Rma43812IP, PI-SPBetaIP, PI-SceI, PI-TfuI, PI-TfuII, PI-ThyI, PI-TliI und PI-TliII.
- 35
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten ~~Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgewählt ist aus~~ der Gruppe der Homing-Endonukleasen bestehend aus den Enzymen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10.
- 40
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen unter Verwendung einer Expressionskassette realisiert wird, die
- 45

74

eine für das besagte Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz beinhaltet.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym geeignet zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an der Erkennungssequenz zur gezielten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen unter Verwendung einer Expressionskassette realisiert wird, die eine für das besagte Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 oder 9 beinhaltet.
19. Organismus enthaltend ein Rekombinationssystem gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9.
20. Organismus nach Ansprüche 19 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Hefen, Algen, Pilze, tierischen oder pflanzlichen Organismen.
21. Organismus nach Anspruch 19 oder 20 ausgewählt aus der Gruppe der pflanzlichen Organismen.
22. Organismus nach einem der Ansprüche 19 oder 22, wobei der pflanzliche Organismus ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Arabidopsis thaliana, Tabak, Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Raps, Mais, Kartoffel, Zuckerrübe, Soja, Sonnenblume, Kürbis oder Erdnuss.
23. Zellkulturen, Organe, Gewebe, Teile oder transgenes Vermehrungsgut abgeleitet von einem Organismus nach den Ansprüchen 19 bis 22.
24. Verwendung eines Organismus nach einem der Ansprüche 19 bis 22 oder von diesem abgeleitete Zellkulturen, Organe, Gewebe, Teile oder transgenes Vermehrungsgut nach Anspruch 23 als Nahrungs-, Futtermittel oder Saatgut oder zur Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

40

45

FIG.1

1/15

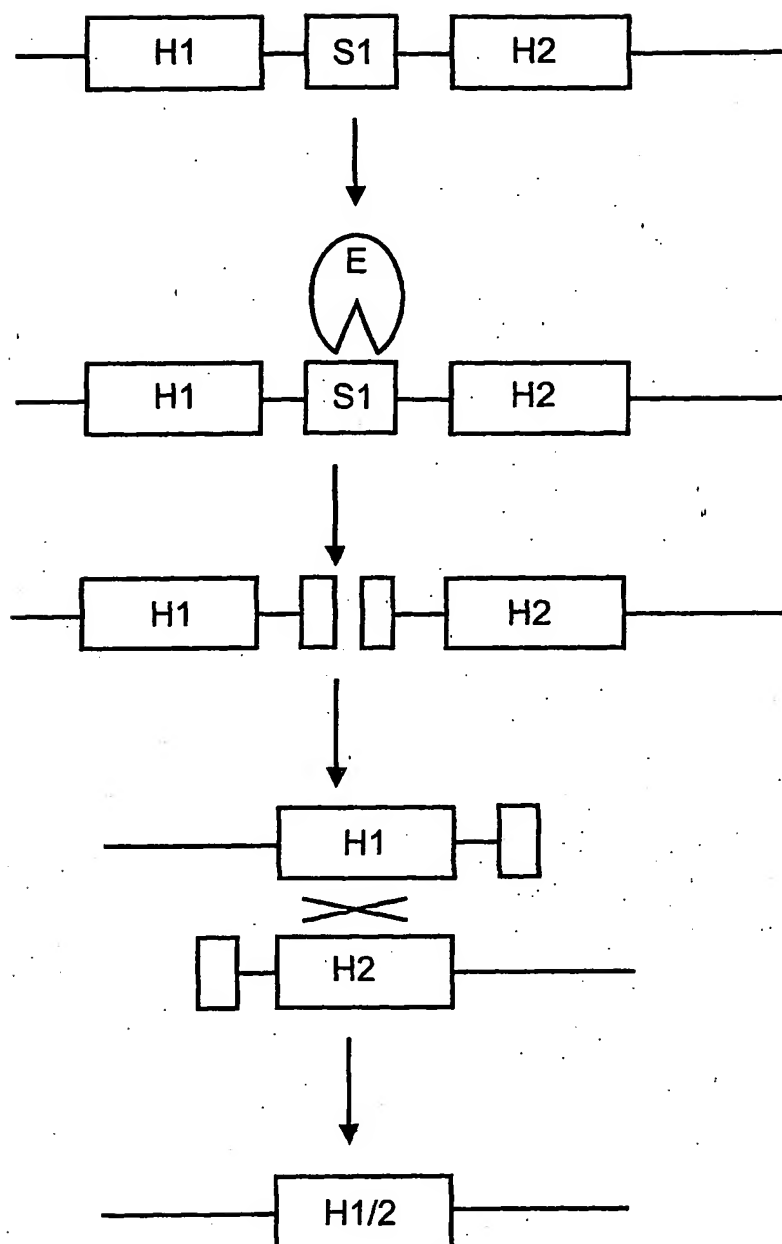




FIG.2

2/15

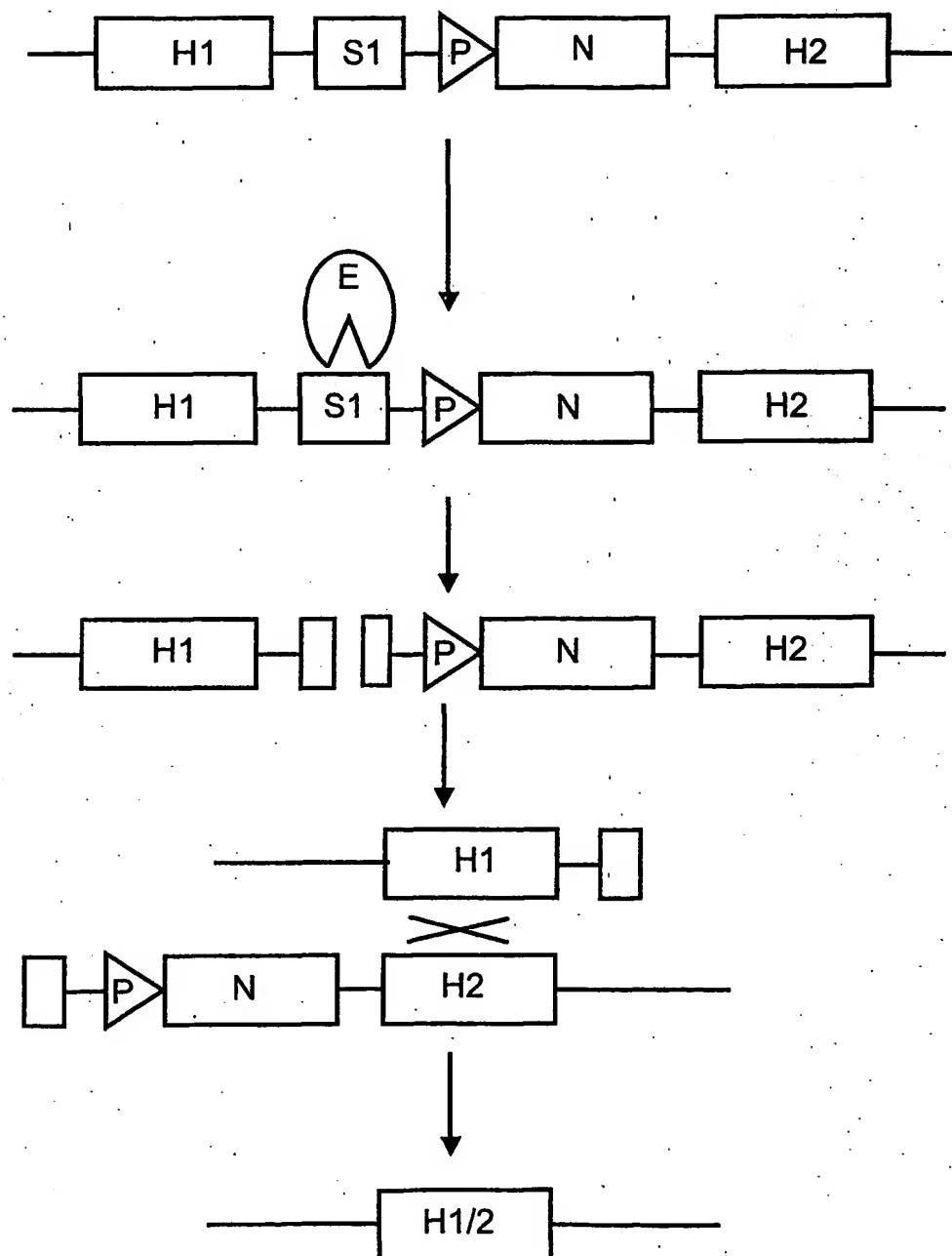


FIG.3

3/15

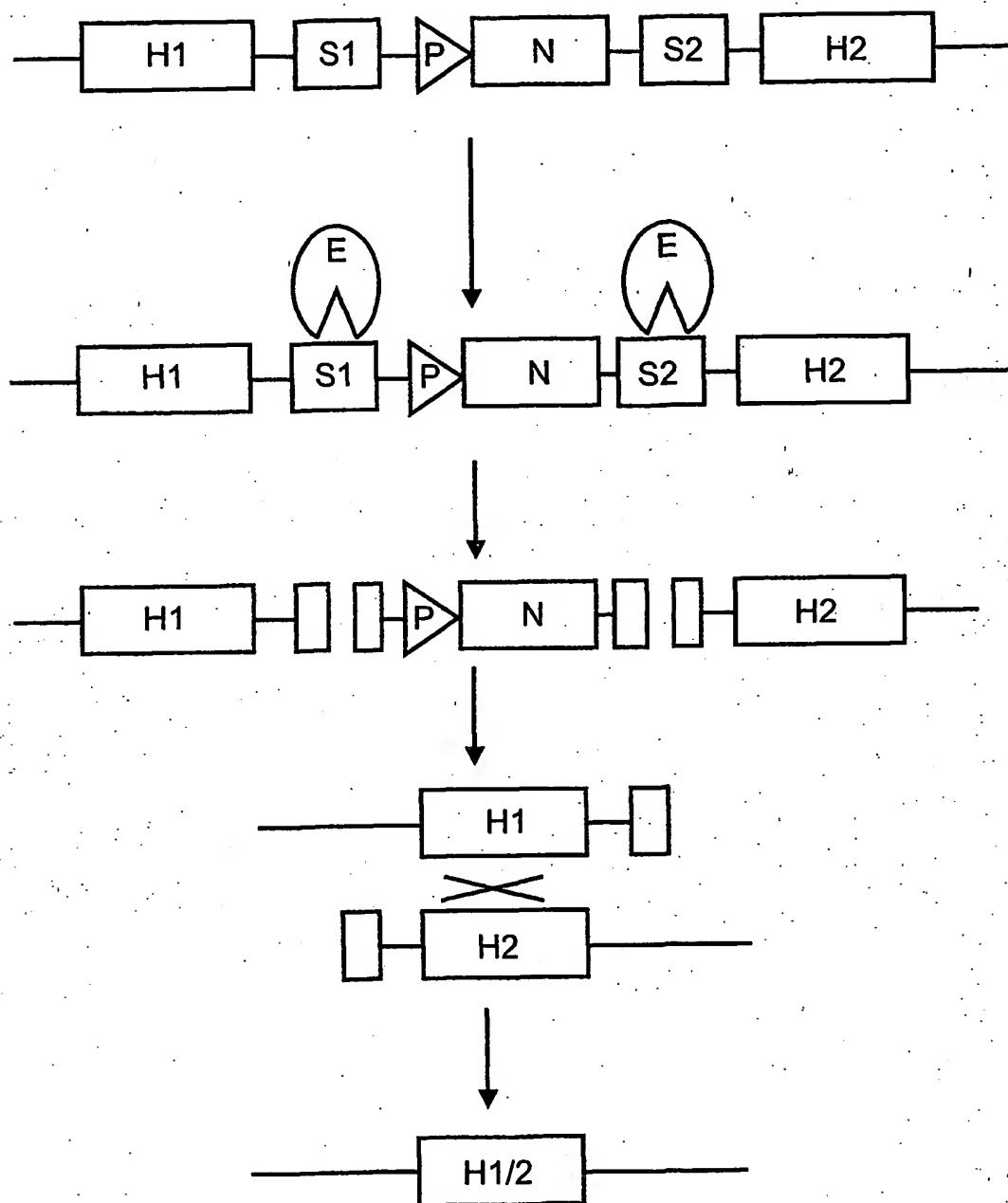


FIG.4

4/15

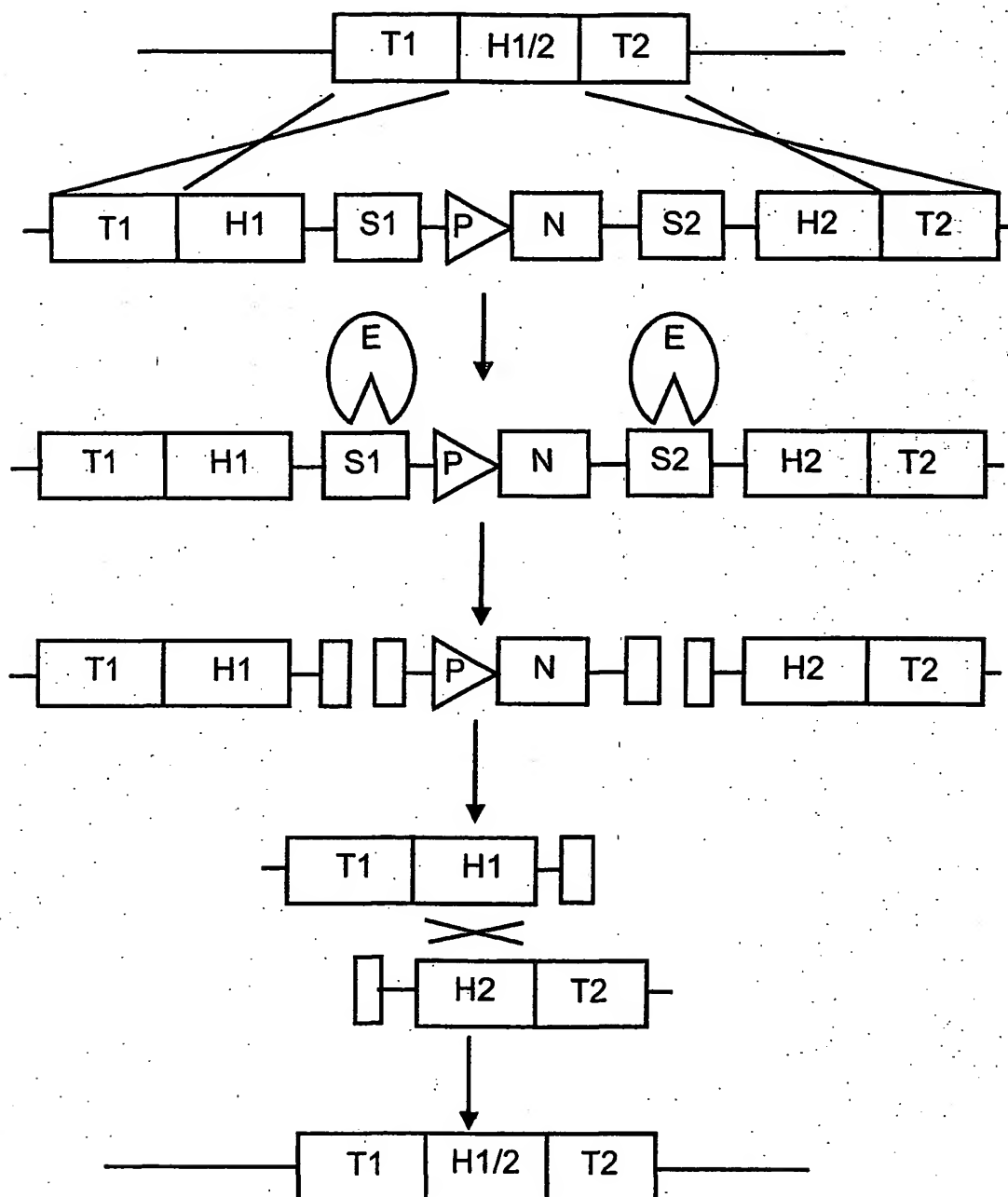


FIG.5

5/15

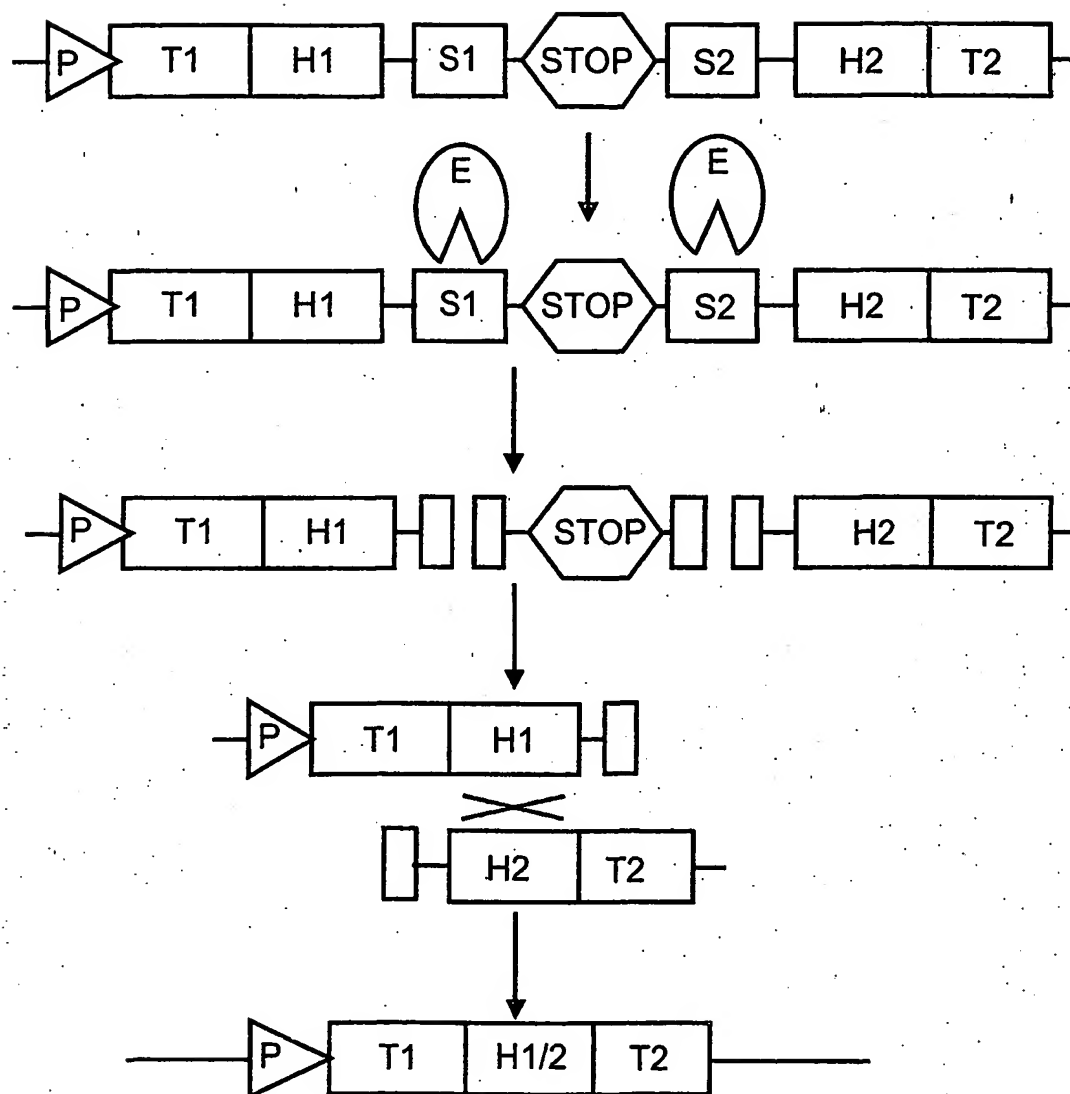
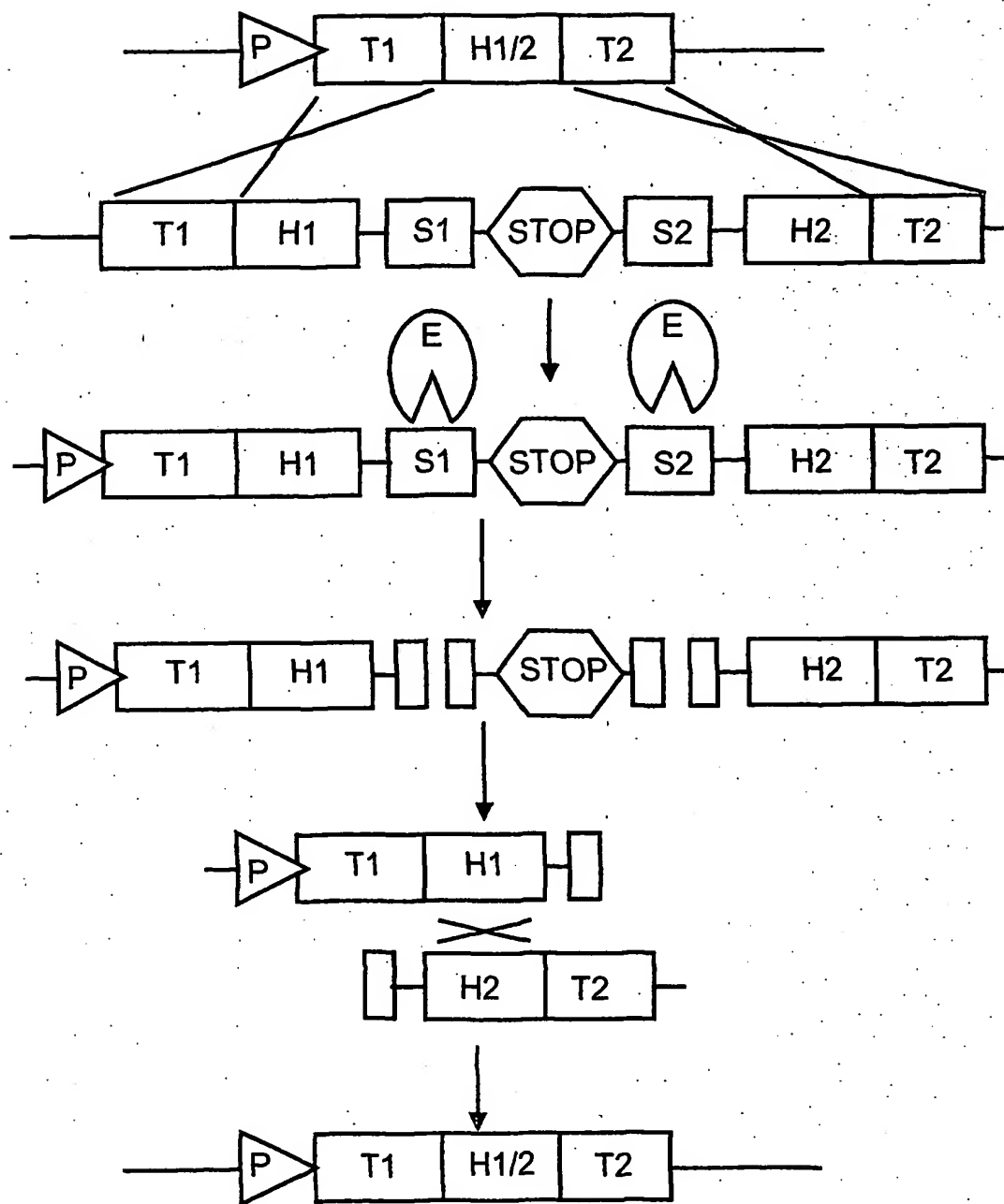


FIG.6

6/15



**FIG.7a**

7/15

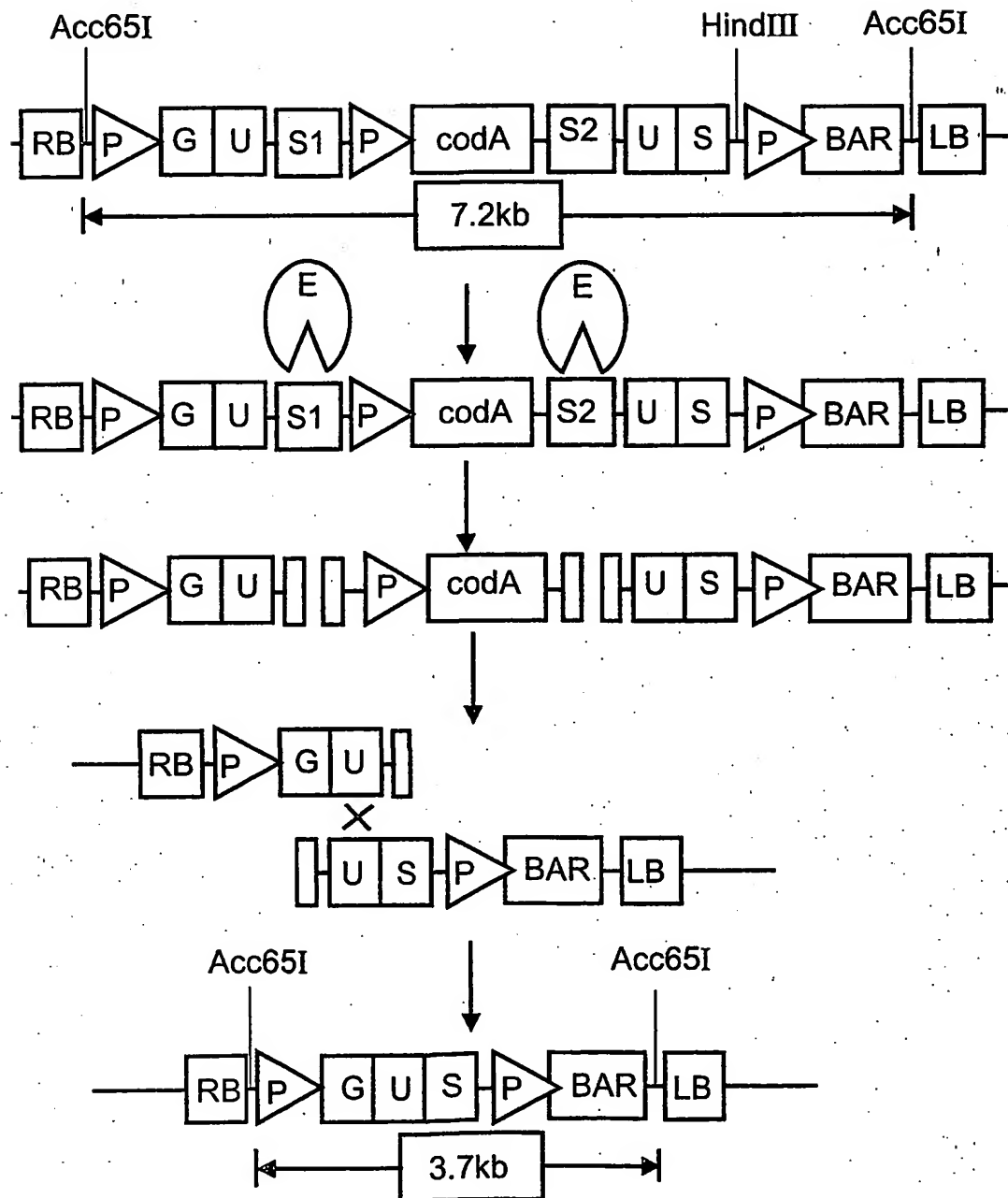


FIG.7b

8/15

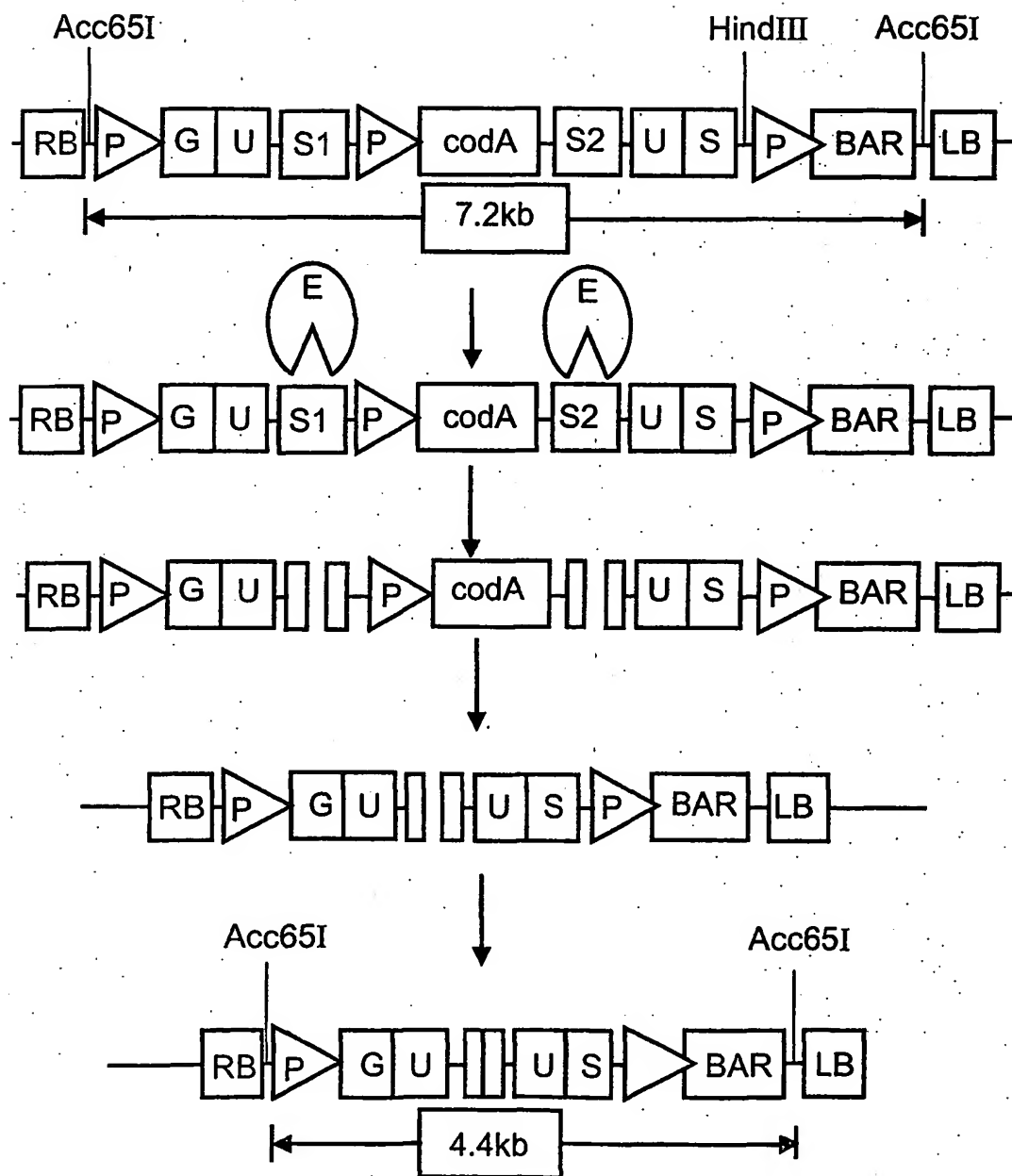


FIG.7c

9/15

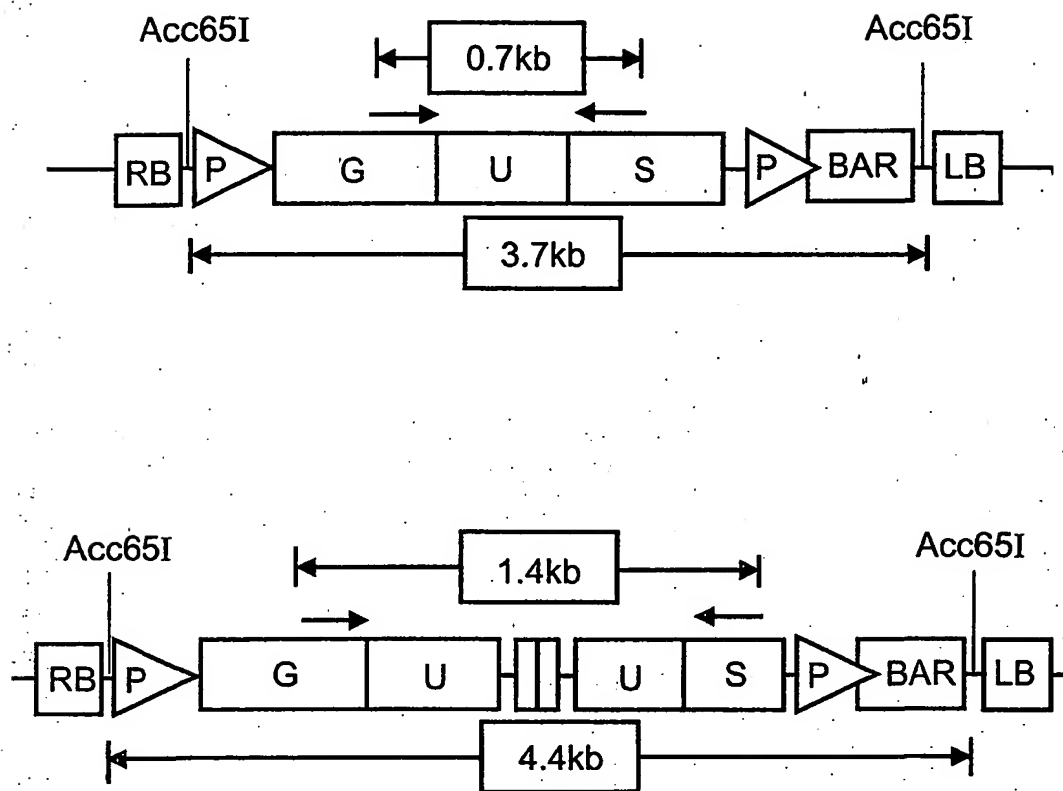




FIG.8

10/15

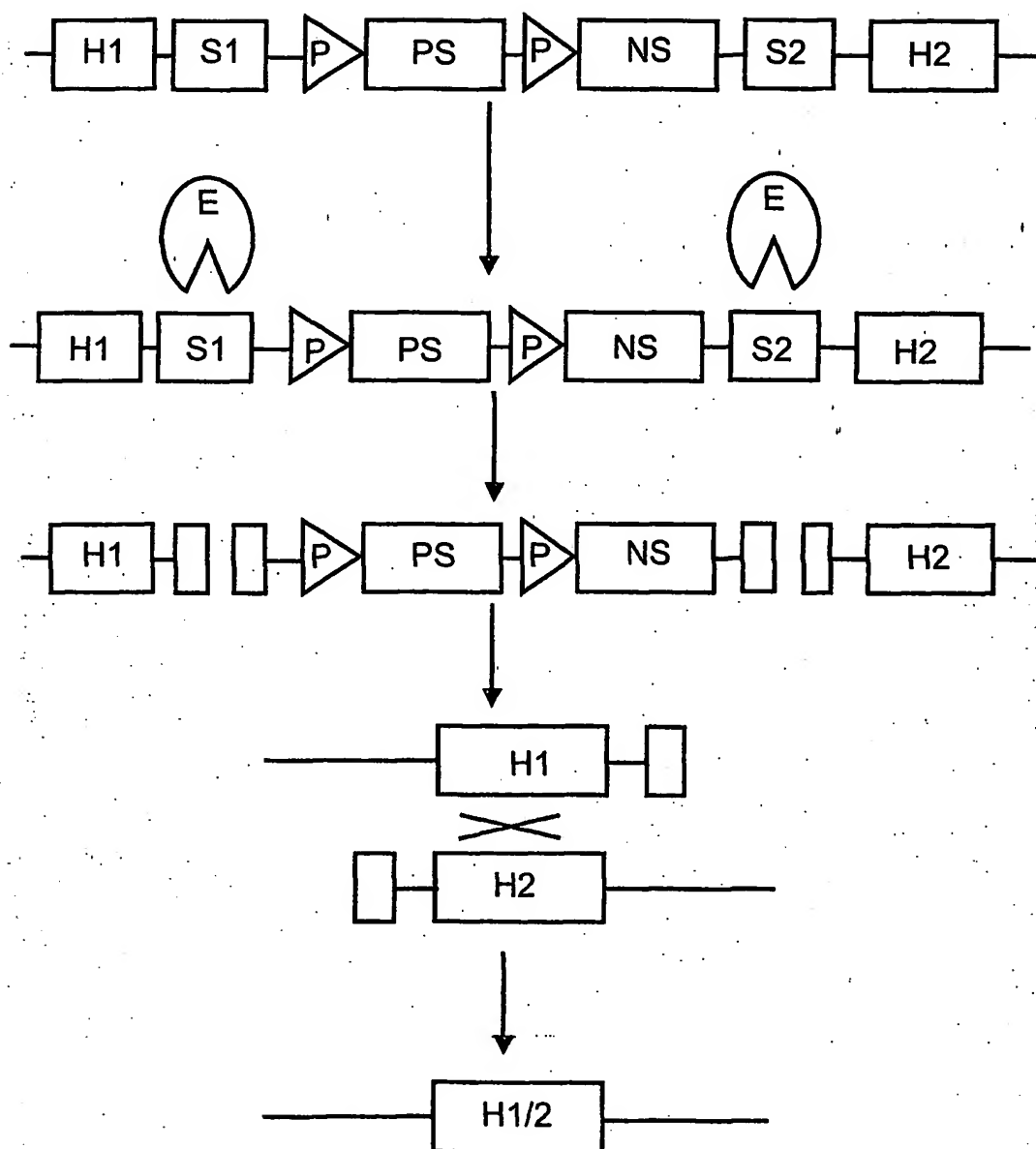


FIG.9

11/15

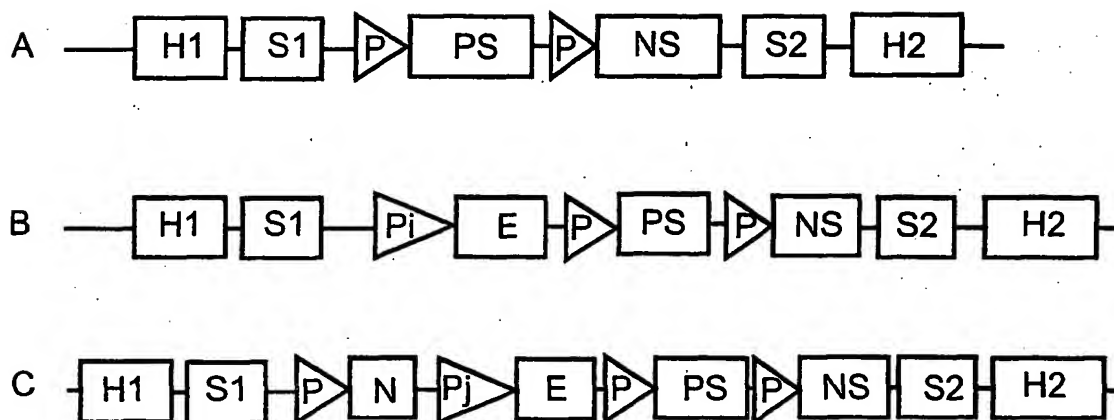
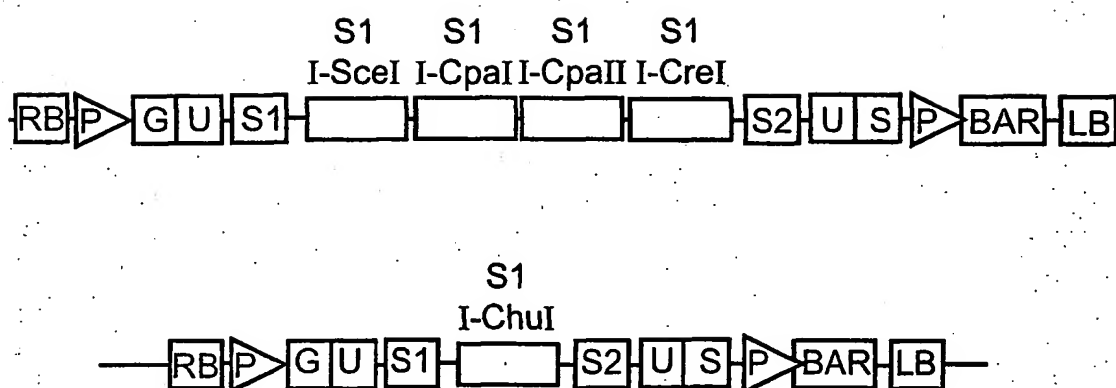


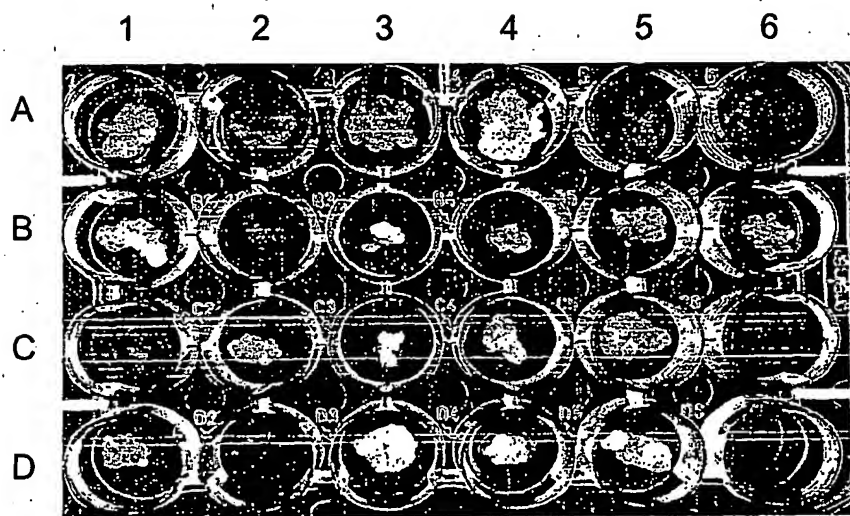
FIG.10

12/15



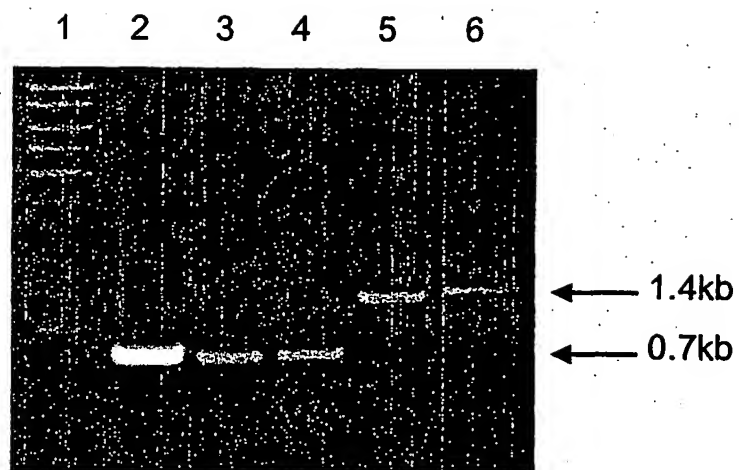
# FIG.11

13/15



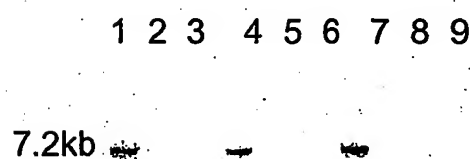
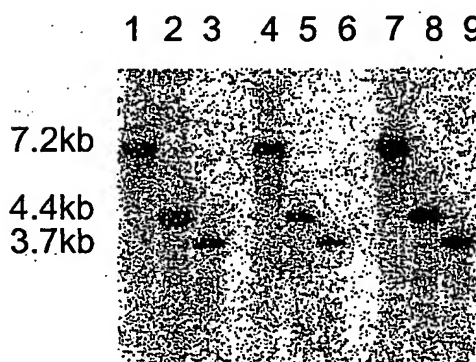
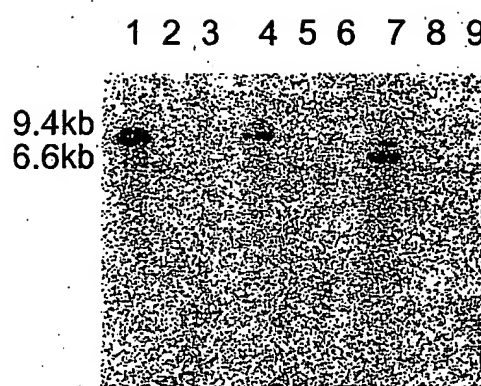
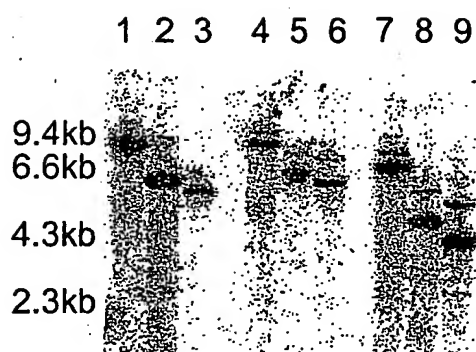
# FIG.12

14/15



# FIG.13

15/15



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co. KGaA

<120> Systeme und Verfahren zum Entfernen von  
Nukleinsäuresequenzen aus der chromosomalen DNA  
eukaryotischer Organismen

&lt;130&gt; NAE502\_2001

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 30

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 788

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Saccharomyces cerevisiae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (62)..(766)

&lt;223&gt; open reading frame coding for I-SceI

&lt;400&gt; 1

```

ggatccagta ctgtacctag aatacaaaga agaggaagaa gaaacctcta cagaagaagt 60
g atg aaa aac atc aaa aaa aac cag gta atg aac ctg ggt ccg aac tct 109
Met Lys Asn Ile Lys Lys Asn Gln Val Met Asn Leu Gly Pro Asn Ser
    1             5             10             15

aaa ctg ctg aaa gaa tac aaa tcc cag ctg atc gaa ctg aac atc gaa 157
Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Lys Ser Gln Leu Ile Glu Leu Asn Ile Glu
    20             25             30

cag ttc gaa gca ggt atc ggt ctg atc ctg ggt gat gct tac atc cgt 205
Gln Phe Glu Ala Gly Ile Gly Leu Ile Leu Gly Asp Ala Tyr Ile Arg
    35             40             45

tct cgt gat gaa ggt aaa acc tac tgt atg cag ttc gag tgg aaa aac 253
Ser Arg Asp Glu Gly Lys Thr Tyr Cys Met Gln Phe Glu Trp Lys Asn
    50             55             60

aaa gca tac atg gac cac gta tgt ctg ctg tac gat cag tgg gta ctg 301
Lys Ala Tyr Met Asp His Val Cys Leu Leu Tyr Asp Gln Trp Val Leu
    65             70             75             80

tcc ccg ccg cac aaa aaa gaa cgt gtt aac cac ctg ggt aac ctg gta 349
Ser Pro Pro His Lys Lys Glu Arg Val Asn His Leu Gly Asn Leu Val
    85             90             95

atc acc tgg ggc gcc cag act ttc aaa cac caa gct ttc aac aaa ctg 397
Ile Thr Trp Gly Ala Gln Thr Phe Lys His Gln Ala Phe Asn Lys Leu
   100             105             110

gct agc ctg ttc atc gtt aac aac aaa aaa acc atc ccg aac aac ctg 445
Ala Ser Leu Phe Ile Val Asn Asn Lys Lys Thr Ile Pro Asn Asn Leu
   115             120             125

gtt gaa aac tac ctg acc ccg atg tct ctg gca tac tgg ttc atg gat 493
Val Glu Asn Tyr Leu Thr Pro Met Ser Leu Ala Tyr Trp Phe Met Asp
   130             135             140

gat ggt ggt aaa tgg gat tac aac aaa aac tct acc aac aaa tcg atc 541
Asp Gly Gly Lys Trp Asp Tyr Asn Lys Asn Ser Thr Asn Lys Ser Ile
   145             150             155             160

```

gta ctg aac acc cag tct ttc act ttc gaa gaa gta gaa tac ctg gtt 589  
 Val Leu Asn Thr Gln Ser Phe Thr Phe Glu Glu Val Glu Tyr Leu Val 165 170 175  
 aag ggt ctg cgt aac aaa ttc caa ctg aac tgt tac cta aaa atc aac 637  
 Lys Gly Leu Arg Asn Lys Phe Gln Leu Asn Cys Tyr Leu Lys Ile Asn 180 185 190  
 aaa aac aaa ccg atc atc tac atc gat tct atg tct tac ctg atc ttc 685  
 Lys Asn Lys Pro Ile Ile Tyr Ile Asp Ser Met Ser Tyr Leu Ile Phe 195 200 205  
 tac aac ctg atc aaa ccg tac ctg atc ccg cag atg atg tac aaa ctg 733  
 Tyr Asn Leu Ile Lys Pro Tyr Leu Ile Pro Gln Met Met Tyr Lys Leu 210 215 220  
 ccg aac act atc tcc tcc gaa act ttc ctg aaa taataagtcg agtactggat 786  
 Pro Asn Thr Ile Ser Ser Glu Thr Phe Leu Lys 225 230 235

cc

788

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 235

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 2

Met Lys Asn Ile Lys Lys Asn Gln Val Met Asn Leu Gly Pro Asn Ser  
 1 5 10 15  
 Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Lys Ser Gln Leu Ile Glu Leu Asn Ile Glu  
 20 25 30  
 Gln Phe Glu Ala Gly Ile Gly Leu Ile Leu Gly Asp Ala Tyr Ile Arg  
 35 40 45  
 Ser Arg Asp Glu Gly Lys Thr Tyr Cys Met Gln Phe Glu Trp Lys Asn  
 50 55 60  
 Lys Ala Tyr Met Asp His Val Cys Leu Leu Tyr Asp Gln Trp Val Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Pro Pro His Lys Lys Glu Arg Val Asn His Leu Gly Asn Leu Val  
 85 90 95  
 Ile Thr Trp Gly Ala Gln Thr Phe Lys His Gln Ala Phe Asn Lys Leu  
 100 105 110  
 Ala Ser Leu Phe Ile Val Asn Asn Lys Lys Thr Ile Pro Asn Asn Leu  
 115 120 125  
 Val Glu Asn Tyr Leu Thr Pro Met Ser Leu Ala Tyr Trp Phe Met Asp  
 130 135 140  
 Asp Gly Gly Lys Trp Asp Tyr Asn Lys Asn Ser Thr Asn Lys Ser Ile  
 145 150 155 160  
 Val Leu Asn Thr Gln Ser Phe Thr Phe Glu Glu Val Glu Tyr Leu Val  
 165 170 175  
 Lys Gly Leu Arg Asn Lys Phe Gln Leu Asn Cys Tyr Leu Lys Ile Asn  
 180 185 190  
 Lys Asn Lys Pro Ile Ile Tyr Ile Asp Ser Met Ser Tyr Leu Ile Phe  
 195 200 205  
 Tyr Asn Leu Ile Lys Pro Tyr Leu Ile Pro Gln Met Met Tyr Lys Leu  
 210 215 220



Pro Asn Thr Ile Ser Ser Glu Thr Phe Leu Lys  
 225 230 235

<210> 3

<211> 746

<212> DNA

<213> Chlamydomonas applanata

<220>

<221> CDS

<222> (54)..(737)

<223> open reading frame of I-ChuI with nuclear location  
 signal

<220>

<221> misc\_feature

<222> (54)..(83)

<223> coding for nuclear location signal

<400> 3

```

ctcgagtacc tagaatacaa agaagaggaa gaagaaactc tatagaagaa gcc atg      56
                                     Met
                                     1

ggt cca aag aaa aag aga aag gtt atc atg tca tta aca caa caa caa      104
Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Met Ser Leu Thr Gln Gln Gln
                    5                      10                      15

aaa gac tta att ttc gga tct cta ctg ggt gat gga aat tta caa act      152
Lys Asp Leu Ile Phe Gly Ser Leu Leu Gly Asp Gly Asn Leu Gln Thr
                    20                      25                      30

ggt tca gta ggt agg act tgg cgc tat cga gcg ctc cat aaa agt gag      200
Gly Ser Val Gly Arg Thr Trp Arg Tyr Arg Ala Leu His Lys Ser Glu
                    35                      40                      45

cat cag aca tac tta ttt cat aag tat gaa atc tta aag ccg ctt tgt      248
His Gln Thr Tyr Leu Phe His Lys Tyr Glu Ile Leu Lys Pro Leu Cys
                    50                      55                      60                      65

ggc gaa aat act ctc cca aca gaa agt ata gtg ttc gac gaa aga aca      296
Gly Glu Asn Thr Leu Pro Thr Glu Ser Ile Val Phe Asp Glu Arg Thr
                    70                      75                      80

aac aag gag gtt aaa cgt tgg ttt ttc aac aca tta acc aat cct tcc      344
Asn Lys Glu Val Lys Arg Trp Phe Phe Asn Thr Leu Thr Asn Pro Ser
                    85                      90                      95

tta aaa ttc ttc gca gac atg ttc tac aca tat gac caa aac aca caa      392
Leu Lys Phe Phe Ala Asp Met Phe Tyr Thr Tyr Asp Gln Asn Thr Gln
                    100                      105                      110

aaa tgg gtt aaa gat gta cct gta aag gtt caa aca ttc tta act cct      440
Lys Trp Val Lys Asp Val Pro Val Lys Val Gln Thr Phe Leu Thr Pro
                    115                      120                      125

caa gct tta gca tac ttt tat ata gac gat gga gcg tta aaa tgg ctt      488
Gln Ala Leu Ala Tyr Phe Tyr Ile Asp Asp Gly Ala Leu Lys Trp Leu
                    130                      135                      140                      145

aat aag tct aac gct atg caa att tgt act gaa agt ttc agt caa ggg      536
Asn Lys Ser Asn Ala Met Gln Ile Cys Thr Glu Ser Phe Ser Gln Gly
                    150                      155                      160

ggc acg att cgg atc caa aaa gca cta aaa acg ctc tat aat att gat      584
Gly Thr Ile Arg Ile Gln Lys Ala Leu Lys Thr Leu Tyr Asn Ile Asp
                    165                      170                      175

```

aca acg ttg aca aaa aaa act cta caa gac ggc aga att ggc tat cgt 632  
 Thr Thr Leu Thr Lys Lys Thr Leu Gln Asp Gly Arg Ile Gly Tyr Arg  
 180 185 190  
 ata gct att cct gaa gcc agt agc ggt gct ttt cgt gaa gtc att aaa 680  
 Ile Ala Ile Pro Glu Ala Ser Ser Gly Ala Phe Arg Glu Val Ile Lys  
 195 200 205  
 cct ttt cta gtt gat tgt atg aga tac aaa gtt tct gat ggc aat aaa 728  
 Pro Phe Leu Val Asp Cys Met Arg Tyr Lys Val Ser Asp Gly Asn Lys  
 210 215 220 225  
 ggc cac ctt tagctcgag 746  
 Gly His Leu

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 228

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydomonas applanata

&lt;400&gt; 4

Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Met Ser Leu Thr Gln Gln  
 1 5 10 15  
 Gln Lys Asp Leu Ile Phe Gly Ser Leu Leu Gly Asp Gly Asn Leu Gln  
 20 25 30  
 Thr Gly Ser Val Gly Arg Thr Trp Arg Tyr Arg Ala Leu His Lys Ser  
 35 40 45  
 Glu His Gln Thr Tyr Leu Phe His Lys Tyr Glu Ile Leu Lys Pro Leu  
 50 55 60  
 Cys Gly Glu Asn Thr Leu Pro Thr Glu Ser Ile Val Phe Asp Glu Arg  
 65 70 75 80  
 Thr Asn Lys Glu Val Lys Arg Trp Phe Phe Asn Thr Leu Thr Asn Pro  
 85 90 95  
 Ser Leu Lys Phe Phe Ala Asp Met Phe Tyr Thr Tyr Asp Gln Asn Thr  
 100 105 110  
 Gln Lys Trp Val Lys Asp Val Pro Val Lys Val Gln Thr Phe Leu Thr  
 115 120 125  
 Pro Gln Ala Leu Ala Tyr Phe Tyr Ile Asp Asp Gly Ala Leu Lys Trp  
 130 135 140  
 Leu Asn Lys Ser Asn Ala Met Gln Ile Cys Thr Glu Ser Phe Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Thr Ile Arg Ile Gln Lys Ala Leu Lys Thr Leu Tyr Asn Ile  
 165 170 175  
 Asp Thr Thr Leu Thr Lys Lys Thr Leu Gln Asp Gly Arg Ile Gly Tyr  
 180 185 190  
 Arg Ile Ala Ile Pro Glu Ala Ser Ser Gly Ala Phe Arg Glu Val Ile  
 195 200 205  
 Lys Pro Phe Leu Val Asp Cys Met Arg Tyr Lys Val Ser Asp Gly Asn  
 210 215 220  
 Lys Gly His Leu  
 225

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 582

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Chlamydomonas reinhardtii

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (55)..(573)

&lt;223&gt; openreading frame coding for I-CreI with nuclear location signal

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (55)..(84)

&lt;223&gt; coding for nuclear location signal

&lt;400&gt; 5

```

ctcgagtacc tagaatacaa agaagaggaa gagaaacctc taccagaaga agcc atg 57
                                         Met
                                         1

ggt cca aag aaa aag aga aag gtt atc atg aat aca aaa tat aat aaa 105
Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys
                    5                      10                      15

gag ttc tta ctc tac tta gca ggg ttt gta gac ggt gac ggt agc ata 153
Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile
                    20                      25                      30

atc gct caa att aag cct aat cag tct tat aaa ttt aag cat cag cta 201
Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu
                    35                      40                      45

tca ctc gcg ttc caa gtc acg caa aag aca cag aga cgt tgg ttt tta 249
Ser Leu Ala Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu
                    50                      55                      60                      65

gac aaa tta gtg gat gaa att ggg gtt ggt tat gta aga gat agg ggt 297
Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly
                    70                      75                      80

agc gtt tcg gat tat att cta agc gaa atc aag cct ttg cat aat ttt 345
Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn Phe
                    85                      90                      95

tta aca caa cta caa cct ttt cta aaa cta aaa caa aaa caa gca aat 393
Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn
                    100                      105                      110

tta gtt tta aaa att att gaa caa ctt ccg tca gca aaa gaa tcc ccg 441
Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro
                    115                      120                      125

gac aaa ttc tta gaa gtt tgt aca tgg gtg gat caa att gca gct ctg 489
Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu
                    130                      135                      140                      145

aat gat tcg aag acg cgt aaa aca act tct gaa acc gtt cgt gct gtg 537
Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val
                    150                      155                      160

cta gac agt tta agt gaa aaa aag aaa tcg tcc ccg tagctcgag 582
Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Ser Pro
                    165                      170

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 173

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Chlamydomonas reinhardtii

&lt;400&gt; 6

```

Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Met Asn Thr Lys Tyr Asn
 1          5          10          15
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
          20          25          30
Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln
          35          40          45
Leu Ser Leu Ala Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
          50          55          60
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Arg
          65          70          75          80
Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
          85          90          95
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
          100          105          110
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
          115          120          125
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
          130          135          140
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
          145          150          155          160
Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Ser Pro
          165          170

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 546

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Chlamydomonas segnis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (52)..(537)

&lt;223&gt; open readings frame coding for I-CpaI with nuclear location signal

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (52)..(81)

&lt;223&gt; coding for nuclear location signal

&lt;400&gt; 7

```

ctcgagtacc tagaatacaa gaagagaaga agaacctcta cagaagaagc c atg ggt 57
                                     Met Gly
                                     1
cca aag aaa aag aga aag gtt atc atg gac att aat cct caa tgg att 105
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Met Asp Ile Asn Pro Gln Trp Ile
          5          10          15
aca ggt ttc gta gat ggg gaa ggt tgt ttt agt gta agt att ctt aga 153
Thr Gly Phe Val Asp Gly Glu Gly Cys Phe Ser Val Ser Ile Leu Arg
          20          25          30
aat aat tcg ttg cgc tat ggc cat cag ctt caa cca gaa ttc gta gtg 201
Asn Asn Ser Leu Arg Tyr Gly His Gln Leu Gln Pro Glu Phe Val Val
          35          40          45          50

```

```

acc caa cat aaa tta gat gca aat gtt tta tat gca tta aaa gac tac 249
Thr Gln His Lys Leu Asp Ala Asn Val Leu Tyr Ala Leu Lys Asp Tyr
      55                      60                      65

ttt aaa gtt gga tca gtc gtt gtg aat cat ggg gaa cgg ctt tgc tat 297
Phe Lys Val Gly Ser Val Val Val Asn His Gly Glu Arg Leu Cys Tyr
      70                      75                      80

aaa gtc aaa aat att gat cac ttt ata acc gtc att ata cca ttt ttc 345
Lys Val Lys Asn Ile Asp His Phe Ile Thr Val Ile Ile Pro Phe Phe
      85                      90                      95

gaa aaa cat gag cta aaa aca aaa aga aga att gaa ttt ctt cga ttt 393
Glu Lys His Glu Leu Lys Thr Lys Arg Arg Ile Glu Phe Leu Arg Phe
    100                      105                      110

cga aaa atc tgc ttg ctg tta aaa gca ggt aga cat tta gaa tcg cag 441
Arg Lys Ile Cys Leu Leu Leu Lys Ala Gly Arg His Leu Glu Ser Gln
    115                      120                      125                      130

gaa gga ttc gag aaa gtg ttg gat tta gca aaa aaa ctc cgt atc aat 489
Glu Gly Phe Glu Lys Val Leu Asp Leu Ala Lys Lys Leu Arg Ile Asn
      135                      140                      145

gag aaa aac tac cag gaa tct atc aaa cgt ttt gaa gaa act ggc gag 537
Glu Lys Asn Tyr Gln Glu Ser Ile Lys Arg Phe Glu Glu Thr Gly Glu
      150                      155                      160

taactcgag 546
<210> 8
<211> 162
<212> PRT
<213> Chlamydomonas segnis
<400> 8
Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Met Asp Ile Asn Pro Gln
  1      5      10      15
Trp Ile Thr Gly Phe Val Asp Gly Glu Gly Cys Phe Ser Val Ser Ile
      20      25      30
Leu Arg Asn Asn Ser Leu Arg Tyr Gly His Gln Leu Gln Pro Glu Phe
      35      40      45
Val Val Thr Gln His Lys Leu Asp Ala Asn Val Leu Tyr Ala Leu Lys
      50      55      60
Asp Tyr Phe Lys Val Gly Ser Val Val Val Asn His Gly Glu Arg Leu
      65      70      75      80
Cys Tyr Lys Val Lys Asn Ile Asp His Phe Ile Thr Val Ile Ile Pro
      85      90      95
Phe Phe Glu Lys His Glu Leu Lys Thr Lys Arg Arg Ile Glu Phe Leu
      100      105      110
Arg Phe Arg Lys Ile Cys Leu Leu Leu Lys Ala Gly Arg His Leu Glu
      115      120      125
Ser Gln Glu Gly Phe Glu Lys Val Leu Asp Leu Ala Lys Lys Leu Arg
      130      135      140
Ile Asn Glu Lys Asn Tyr Gln Glu Ser Ile Lys Arg Phe Glu Glu Thr
      145      150      155      160
Gly Glu

```

ctcgagtacc tagaaacaaa gaagaggaag aagaaactct acagaagaag cc atg ggt 58																
Met Gly																
1																
cca	aag	aaa	aag	aga	aag	gtt	atc	atg	acc	gat	tct	aaa	tct	aga	aac	106
Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Ile	Met	Thr	Asp	Ser	Lys	Ser	Arg	Asn	
		5				10						15				
aac	aat	aat	ttt	tta	agc	aat	aat	ctt	tta	cct	ttg	acc	gat	gac	gag	154
Asn	Asn	Asn	Phe	Leu	Ser	Asn	Asn	Leu	Leu	Pro	Leu	Thr	Asp	Asp	Glu	
20						25				30						
aag	gct	tta	att	gcg	ggg	aca	ctt	tta	ggg	gat	gct	cat	att	caa	aag	202
Lys	Ala	Leu	Ile	Ala	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Asp	Ala	His	Ile	Gln	Lys	
35				40						45				50		
cgt	ggt	gat	agc	tat	agg	cta	aaa	ata	gct	cat	ggc	ttg	gat	cat	gaa	250
Arg	Gly	Asp	Ser	Tyr	Arg	Leu	Lys	Ile	Ala	His	Gly	Leu	Asp	His	Glu	
				55				60						65		
gag	ctt	gtc	gtc	tgg	aag	tat	aac	cgt	tta	atc	agg	ttg	tgt	caa	aca	298
Glu	Leu	Val	Val	Trp	Lys	Tyr	Asn	Arg	Leu	Ile	Arg	Leu	Cys	Gln	Thr	
		70						75				80				
aca	caa	ccc	cca	agg	gtg	gaa	acc	tac	tca	aca	aag	tta	aag	tct	ggc	346
Thr	Gln	Pro	Pro	Arg	Val	Glu	Thr	Tyr	Ser	Thr	Lys	Leu	Lys	Ser	Gly	
		85				90						95				
gta	ttg	cct	caa	ggg	gtt	gtt	ttc	tat	acc	tcg	tcc	gga	aag	tat	tta	394
Val	Leu	Pro	Gln	Gly	Val	Val	Phe	Tyr	Thr	Ser	Ser	Gly	Lys	Tyr	Leu	
100						105				110						
aaa	gag	act	tat	gac	ctt	ttt	tat	aaa	caa	act	gca	gac	ggt	cgg	agg	442
Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Leu	Phe	Tyr	Lys	Gln	Thr	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	
115				120						125				130		
gta	aaa	aca	ata	aca	cag	gag	ttg	atc	gac	agt	tta	ccc	aag	cat	cca	490
Val	Lys	Thr	Ile	Thr	Gln	Glu	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	Pro	Lys	His	Pro	
				135				140						145		
ttg	gtc	tta	gca	gcc	ttt	ttt	atg	gac	gat	ggt	agt	gtt	cgg	tcc	gac	538
Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Phe	Phe	Met	Asp	Asp	Gly	Ser	Val	Arg	Ser	Asp	
		150						155				160				
tgt	tat	tca	gga	aag	att	gca	acg	cca	ggg	ttt	gct	ggt	aaa	gaa	gaa	586
Cys	Tyr	Ser	Gly	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Gly	Phe	Ala	Gly	Lys	Glu	Glu	
		165				170						175				

```

agc cag ttg ttg tgt aac tat cta cac agt tgg gat gtt caa gca aac 634
Ser Gln Leu Leu Cys Asn Tyr Leu His Ser Trp Asp Val Gln Ala Asn
180 185 190

gta gtt gct cat aaa aaa gca aac aat cag tat tac att ggg ctc cca 682
Val Val Ala His Lys Lys Ala Asn Asn Gln Tyr Tyr Ile Gly Leu Pro
195 200 205 210

gca aaa aca ttt ggt cgc ttt att aac att att gaa ccc tac gtt aga 730
Ala Lys Thr Phe Gly Arg Phe Ile Asn Ile Ile Glu Pro Tyr Val Arg
215 220 225

gaa gtt cct gct tta tgt tat aaa tta aac gaa tca aga aaa ccc cgt 778
Glu Val Pro Ala Leu Cys Tyr Lys Leu Asn Glu Ser Arg Lys Pro Arg
230 235 240

aac gac tgactcgag 793
Asn Asp

<210> 10
<211> 244
<212> PRT
<213> Chlamydomonas segnis

<400> 10
Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ile Met Thr Asp Ser Lys Ser
1 5 10 15
Arg Asn Asn Asn Asn Phe Leu Ser Asn Asn Leu Leu Pro Leu Thr Asp
20 25 30
Asp Glu Lys Ala Leu Ile Ala Gly Thr Leu Leu Gly Asp Ala His Ile
35 40 45
Gln Lys Arg Gly Asp Ser Tyr Arg Leu Lys Ile Ala His Gly Leu Asp
50 55 60
His Glu Glu Leu Val Val Trp Lys Tyr Asn Arg Leu Ile Arg Leu Cys
65 70 75 80
Gln Thr Thr Gln Pro Pro Arg Val Glu Thr Tyr Ser Thr Lys Leu Lys
85 90 95
Ser Gly Val Leu Pro Gln Gly Val Val Phe Tyr Thr Ser Ser Gly Lys
100 105 110
Tyr Leu Lys Glu Thr Tyr Asp Leu Phe Tyr Lys Gln Thr Ala Asp Gly
115 120 125
Arg Arg Val Lys Thr Ile Thr Gln Glu Leu Ile Asp Ser Leu Pro Lys
130 135 140
His Pro Leu Val Leu Ala Ala Phe Phe Met Asp Asp Gly Ser Val Arg
145 150 155 160
Ser Asp Cys Tyr Ser Gly Lys Ile Ala Thr Pro Gly Phe Ala Gly Lys
165 170 175
Glu Glu Ser Gln Leu Leu Cys Asn Tyr Leu His Ser Trp Asp Val Gln
180 185 190
Ala Asn Val Val Ala His Lys Lys Ala Asn Asn Gln Tyr Tyr Ile Gly
195 200 205
Leu Pro Ala Lys Thr Phe Gly Arg Phe Ile Asn Ile Ile Glu Pro Tyr
210 215 220
Val Arg Glu Val Pro Ala Leu Cys Tyr Lys Leu Asn Glu Ser Arg Lys
225 230 235 240

```

Pro Arg Asn Asp

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 11

cggctcgagc tacggggacg atttcttttt ttcac

35

<210> 12

<211> 120

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 12

cggctcgagt acctagaata caaagaagag gaagaagaaa cctctacaga agaagccatg 60  
ggtccaaaga aaaagagaaa ggttatcatg aatacaaaat ataataaaga gttcttactc 120

<210> 13

<211> 116

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 13

cggctcgagt acctagaata caaagaagag gaagaagaaa cctctacaga agaagccatg 60  
ggtccaaaga aaaagagaaa ggttatcatg gacattaatc ctcaatggat tacagg 116

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 14

cggctcgagt tactcgccag tttcttcaaa acg

33

<210> 15

<211> 113

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 15

cggctcgagt acctagaata caaagaagag gaagaagaaa cctctacaga agaagccatg 60  
ggtccaaaga aaaagagaaa ggttatcatg accgattcta aatctagaaa caa 113



<210> 16  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 16  
cggctcgagc taaaggtggc ctttattgcc atcag 35  
<210> 17  
<211> 114  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 17  
cggctcgagt acctagaata caaagaagag gaagaagaaa cctctacaga agaagccatg 60  
ggtccaaaga aaaagagaaa gggtatcatg tcattaacac aacaacaaaa agac 114  
<210> 18  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 18  
cggctcgagc taaaggtggc ctttattgcc atcag 35  
<210> 19  
<211> 66  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 19  
cggctctaga gcggccgcct agggataaca gggtaataga atcccacaaa aatctgagct 60  
taacag 66  
<210> 20  
<211> 65  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 20  
cggctctaga ctattaccct gttatcccta ggcccgatct agtaacatag atgacaccgc 60  
gcgcg 65  
<210> 21  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 21  
cggaagcttc gtcaccaatc ccaattcgat ctac 34  
<210> 22  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 22  
cggaagcttc cacttgcaaa gtcccgcgtag tgcc 34  
<210> 23  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 23  
cggaagcttc gtcaccaatc ccaattcgat ctac 34  
<210> 24  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 24  
cggaagcttc cacttgcaaa gtcccgcgtag tgcc 34  
<210> 25  
<211> 62  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 25  
ctagtacaaa acgtcgtgag acattttaat ctgaagggtt ggcacctcga tgcgggtca 60  
tc 62  
<210> 26  
<211> 62  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 26  
ctaggatgag ccgtcatcga ggtgccaaac cttcagatta aaatgtctca cgacgttttg 60  
ta 62

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 27

ctagtccgaa aacgccgtga gacatattgg ttacgatcct aaggtagcga aattcacccg 60  
gtaactctgt gccag 75

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 28

ctagctggca cagagttacc gggatgaattt cgctacctta ggatcgtaac caatatgtct 60  
cacggcggtt tcgga 75

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: nuclear  
location sequence

&lt;400&gt; 29

Pro Lys Thr Lys Arg Lys Val  
1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: nuclear  
location sequence

&lt;400&gt; 30

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**